



TITLE:

葉の向背軸依存的な形態形成に関
わる遺伝子発現動態の解析(
Dissertation_全文)

AUTHOR(S):

爲重, 才覚

CITATION:

爲重, 才覚. 葉の向背軸依存的な形態形成に関わる遺伝子発現動態の解
析. 京都大学, 2013, 博士(理学)

ISSUE DATE:

2013-09-24

URL:

<https://doi.org/10.14989/doctor.k17852>

RIGHT:

主論文

平成 25 年度
学位申請論文

題目

葉の向背軸依存的な形態形成に関わる遺伝子発現動態の解析

申請者

理学研究科 生物科学専攻 植物学教室 植物分子遺伝学分科
爲重 才覚

目次

| | |
|---|----|
| 要旨 | 1 |
| 略語 | 3 |
| 第一章 序章 | |
| 1-1. 葉の平面性と向背軸に沿った非対称性とその意義 | 4 |
| 1-2. 葉の発生過程 | 5 |
| 1-3. 葉の平面性と非対称性を与える上で重要な遺伝子 | 6 |
| 1-4. 葉原基において向軸側と背軸側に特異的な遺伝子発現を制御する既知の仕組みと問題点 | 8 |
| 1-5. <i>FIL</i> と <i>PHB</i> 様遺伝子の発現パターン | 10 |
| 1-6. 本研究における課題とアプローチ | 11 |
| 第二章 材料と方法 | |
| 2-1. 植物材料 | 13 |
| 2-2. 植物の生育 | 13 |
| 2-3. 掛け合わせ | 14 |
| 2-4. 次世代シーケンサーによるゲノムリシーケンス | 14 |
| 2-5. 実体顕微鏡による観察 | 15 |
| 2-6. 共焦点レーザースキャン顕微鏡による観察 | 15 |
| 2-7. 走査型電子顕微鏡による観察 | 15 |
| 2-8. 透過型電子顕微鏡による観察 | 16 |
| 2-9. DNA の抽出 | 16 |
| 2-10. <i>ENF2</i> mRNA のスプライシング異常の解析 | 16 |
| 2-11. qRT-PCR による遺伝子発現レベルの定量 | 17 |
| 2-12. DNA コンストラクトと植物への形質転換 | 17 |
| 2-13. その他の分子生物学的な解析 | 18 |
| 2-14. 数理モデルと計算機シミュレーション | 19 |
| 第三章 結果 | |
| 3-1. 野生型における <i>FIL</i> と <i>PHB</i> 発現領域の変化 | 20 |
| 3-2. <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現動態に異常を示す変異体 <i>enlarged fil expression domain2 (enf2)</i> の解析 | 26 |

| | |
|---|----|
| 3-3. <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現動態に異常を示す <i>PHB</i> 様遺伝子の変異体の解析 | 31 |
| 3-4. 変異体 <i>enf2</i> の原因遺伝子と <i>enf2</i> のエンハンサー変異の同定と機能解析 | 33 |
| 3-5. 葉緑体の発達阻害による <i>enf2</i> 表現型の再現 | 38 |
| 3-6. プラスチド遺伝子発現に関わる変異体 <i>flavodentata</i> (<i>flv</i>) の表現型 | 39 |
| 3-7. <i>enf2</i> におけるプラスチド遺伝子の発現低下 | 41 |
| 3-8. ノルフラゾン処理による影響とプラスチドの直接的な翻訳阻害の影響との違い | 42 |
| 3-9. <i>GUN1</i> 遺伝子の変異によるプラスチド遺伝子発現阻害効果の抑圧 | 42 |

第四章 考察

| | |
|---|----|
| 4-1. 葉の発生における <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現領域の境界移動の重要性 | 46 |
| 4-2. <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現動態制御に関わる <i>PHB</i> 様遺伝子の役割 | 51 |
| 4-3. ENF2 タンパク質の分子機能 | 52 |
| 4-4. プラスチド遺伝子発現と <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現動態 | 53 |
| 4-5. <i>FIL</i> と <i>PHB</i> の発現動態と似た振る舞いをする数理モデルの解析 | 58 |
| 4-6. 結語 | 64 |

| | |
|------|----|
| 参考文献 | 67 |
|------|----|

| | |
|----|----|
| 謝辞 | 77 |
|----|----|

図表

図 1-図 24

表 1-表 3

要旨

一般的に植物の葉は平面的で、向軸側(表側)と背軸側(裏側)との組織形態の非対称性を持つ。この平面性と非対称性という形態的特徴は、葉全体の光合成効率を高めるための構造的基盤と考えられる。

平面的で非対称な葉も、発生過程を遡れば、未分化細胞の塊である葉原基から生じる。未分化で半球形の葉原基が成熟葉になる過程で側方へ方向性を持った組織成長と向軸側と背軸側での非対称な細胞分化を起こす。このとき、葉原基の向軸側と背軸側それぞれで異なる遺伝子群が特異的に発現して、それぞれの細胞分化と側方への細胞分裂を促すことが知られている。こうした遺伝子群のうち、シロイヌナズナの *FILAMENTOUS FLOWER (FIL)* は葉原基の背軸側で、*PHABULOSA (PHB)* は向軸側で、わずかな重複があるが葉原基を二分するように発現する。*FIL* と *PHB* を含め背軸側と向軸側に特異的な遺伝子発現領域は葉の発生開始時に形成されて、後の発生段階を通じて維持され则认为られて来た。しかし、これらの遺伝子発現が本当に細胞系譜を通じて維持されるのか、なんらかの変化をするのか、という点はこれまで十分な検証がなされて来なかった。本研究では、この問題を出発点として、*FIL* と *PHB* の発現領域を葉の発生過程を通じて観察した結果、両領域が発生の進行とともに変化することを発見した。さらにこの発現領域変化がどのような分子機構に基づいて進行するのか理解を深めるため、その過程に異常を示す変異体の解析を行った。

まず野生型の葉原基において、*FIL* と *PHB* の両発現領域の境界は発生初期ほど向軸側寄りに位置し、後期ほど背軸側寄りに位置していた。さらに *FIL* 発現細胞の系譜を追跡する実験から、葉の発生最初期には葉の全ての細胞で一度 *FIL* を発現し、後の発生過程で向軸側の細胞から順に *FIL* の発現を止めて *PHB* を発現するという切り替えが、次々と起きていることを見出した。

次に、*FIL* の発現領域が野生型より広く見えることが知られている変異体 *enlarged fil expression domain2 (enf2)* を詳しく観察したところ、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界が背軸側へ移動するのが野生型より遅くなっていた。この変異体の成熟葉は細い形態を示すとともに、背軸側組織様の性質が向軸側に位置する組織にまで見られる。一方 *PHB* の半優性変異体 *phb-1d/+* の成熟葉は細い、あるいはカップ状の形態を示し、向軸側組織様の性質が背軸側の組織にまで見られることが知られている。この *phb-1d/+* 変異体を観察したところ、野生型アリル由来の *PHB* と *FIL* の発現領域の境界が野生型よりも速く背軸側へ移動し

ていた。これら二つの変異体の観察結果から、*PHB* と *FIL* の発現領域の境界が背軸側へ移動する速度が、葉の細胞に向軸側と背軸側の性質を適切に与える上で重要であることが示唆された。

また、*enf2* の原因遺伝子は機能未知のプラスチドタンパク質をコードすることが知られていたので、プラスチドの何らかの機能が *PHB* と *FIL* の発現制御を介して葉の形態形成に関わっていることが示唆された。そこで野生型植物においていくつかの条件でプラスチド機能を阻害したところ、プラスチド遺伝子の発現阻害によって *enf2* とよく似た *FIL* と *PHB* の発現異常が見られた。さらに *enf2* においては、プラスチド遺伝子の発現レベルが全体的に低下していたことから、これが原因となって *enf2* における *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動を遅らせていると考えられた。プラスチドの遺伝子発現状態は核における遺伝子発現制御に影響するが、この影響は主に *GENOMES UNCOUPLED1 (GUN1)* という遺伝子の機能に依存して生じることが知られている。そこで *enf2* 背景で *GUN1* の機能欠損変異を導入したところ、*FIL* と *PHB* の発現についての異常も葉の形態異常も抑圧された。これらの結果から、葉原基においてプラスチド遺伝子発現が阻害されると、*GUN1* 依存的な機構で各細胞が *FIL* の発現状態から *PHB* の発現状態に切り替わるのが遅れて、そのため葉の形態変化を起こすという新たなメカニズムが示唆された。

本研究の結果は、これまで見過ごされてきた葉の形態の重要な制御側面として *FIL* と *PHB* の動的な発現変化を提示する。この成果に基づいて、葉がどのようにして平面的で非対称的な構造として発生するのか、という問題の解明が今後さらに進むものと期待される。また本研究では *FIL* と *PHB* 発現動態がプラスチド遺伝子発現の状態に応じて制御されるという新しい現象を明らかにしている。この成果を契機として、プラスチド機能の研究分野と葉の形態形成の研究分野を融合した新たな研究の展開が今後期待される。

略語 (アルファベット順)

| | |
|----------------|---|
| 35Spro | Cauliflower Mosaic Virus 35S promoter |
| ABI4 | ABA-INSENSITIVE4 |
| ARF | AUXIN RESPONSE FACTOR |
| AS2 | ASYMMETRIC LEAVES2 |
| DEX | Dexamethasone (デキサメタゾン) |
| DIC | differential interference contrast |
| DNA | deoxyribonucleotic acid |
| ENE | ENF2 ENHANCER |
| ENF2 | ENLARGED FIL EXPRESSION DOMAIN2 |
| ETT | ETTIN |
| FIL | FILAMENTOUS FLOWER |
| FLV | FLAVODENTATA |
| GFP | GREEN FLUORESCENT PROTEIN |
| GLK1 | GOLDEN2-LIKE1 |
| GR | glucocorticoid receptor (グルココルチコイド受容体) |
| GUN | GENOMES UNCOUPLED |
| KAN | KANADI |
| miR | microRNA |
| P1 (P2, P3...) | plastochrone 1 (plastochrone 2, plastochrone3...) |
| PCR | polymerase chain reaction |
| PHB | PHABULOSA |
| PHV | PHAVOLUTA |
| REV | REVOLUTA |
| RNA | ribonucleotic acid |
| RT-PCR | reverse transcription-PCR |
| SUS2 | ABNORMAL SUSPENSOR2 |
| tasiR-ARFs | trans-acting short interfering RNA targeted to ARFs |
| WOX | WUSCHEL-RELATED HOMEBOX |
| YAB | YABBY |
| YFP | YELLOW FLUORESCENT PROTEIN |

第一部 序章

1-1. 葉の平面性と向背軸に沿った非対称性とその意義

陸上植物の主な光合成器官である葉は、一般に平面的で表側と裏側での組織の非対称性が見られる。この平面性と表裏の非対称性は、葉が光合成を効率的に行う上で非常に重要な形態的側面である。本研究は、この平面的で非対称な葉の形態がどのような機構で形成されるのか、どのような要因によって制御されるのか、という問題の解明を目指して行ったものである。

まず、表側と裏側という語は日常用語であり、恣意的に空を向いている側と地面を向いている側を指すと考えられるが、発生学的観点からは表側は向軸側、裏側は背軸側と言い換えることができる。向軸側とは茎の伸長方向の軸に向いている側であり、背軸側とは茎の伸長方向の軸に背いている側である(図 1A)。茎は多くの場合重力に逆らって伸びるので、向軸側は太陽光のよく当たる表側、背軸側は陰になる裏側になるのである。そして、向軸側から背軸側にかけての方向に、仮想的な軸があるものとしてこれを向背軸と呼ぶ。この向背軸という概念は、たとえばヒトの体における前後軸のような概念であり、ヒトの場合前側から順に決まった位置に腹側の筋肉、消化器系、脊椎や神経系、背側の筋肉などが形成されているように、葉においても向背軸に沿って決まった位置に決まった組織が形成されている。たとえば、双子葉植物の葉においては、向軸側から順に向軸側表皮組織、柵状組織、海綿状組織、背軸側表皮組織という異なる構造と機能を持った組織の層が並び、海綿状組織の内部を維管束組織が網目状に張り巡らされている(図 1B)。柵状組織は細長い葉肉細胞が隙間無く並んだものであり、海綿状組織は凹凸のある葉肉細胞が隙間を開けて並んでいる(図 1B)。この葉肉構造によって向軸側の柵状組織で光の大部分を吸収し、背軸側の海綿状組織ではもれてきたわずかな光も複雑な構造で余さず乱反射させて葉の内部で吸収できる。また海綿状組織の細胞間隙によって効率的に二酸化炭素や酸素、水蒸気といった光合成に関わるガス交換を行える。表皮においても向軸側より背軸側に気孔が高密度で形成されている場合が多く、これは背軸側で効率的にガス交換する上で合理的な気孔の配置である。他にも、維管束において向軸側と背軸側に木部と師部が配置されていることなど、様々な向軸側と背軸側との細胞分化の非対称性が見られる。このように、平面的な形態によって広い面積で受光するとともに、向背軸に沿って非対称な構造を持つことで、葉は

優れた光の利用効率と、光合成基質と産物の輸送効率を発揮し、単なる光合成細胞の塊よりもはるかに機能的な器官たりえているのである。

1-2. 葉の発生過程

平面的で非対称な構造を持つ葉も、多細胞生物のあらゆる器官と同様に、発生過程を遡って見ると少数のほぼ均質な構造を持つ未分化細胞群に由来する。葉になる運命が決定する以前の細胞は茎頂分裂組織の一部として存在しており(図 2A)、茎頂分裂組織の一部であるうちは葉にも茎にも他の器官の細胞にも分化できるがそのどれにもまだ分化していない状態にあると考えられている(Sussex, 1989)。そして、茎頂分裂組織の周縁領域の細胞が、あるときから活発な分裂をすることで半球形に突出した細胞塊が形成され、これが葉原基として発生を続けることで成熟した葉になる(図 2A)。なお、このとき茎頂分裂組織からの突出として見える以前の葉原基予定領域の細胞群を P0 期、半球状の膨らみとして見え始めたばかりの葉原基を P1 期の葉原基と慣習的に呼ぶ(Long and Barton, 2000) (図 2A)。その後の発生過程では、既存の葉原基の発生が進むと同時に一つずつ新たな P1 葉原基が茎頂分裂組織から出現するので、それに伴って P1 期だった葉原基は P2 期へ、P2 期だったものは P3 期へと、発生段階が進んだものとして呼び方も変わる(Long and Barton, 2000)。

葉原基の中では茎頂分裂組織中央に向いている側が向軸側、それと反対側が背軸側に相当するが(図 2A)、P1 期頃には未だ半球形に近く、向軸側と背軸側それぞれの細胞で形態や内部構造に明確な差異はない、つまり平面性と非対称性は形態レベルでは見られない(Lyndon, 1998)。その後の発生過程では、モデル植物のシロイヌナズナの場合 P3 期頃から、向背軸と直交する側方方向へ細胞分裂する傾向が顕著になるため次第に平面的な器官形態になる。また、同時に徐々に向軸側と背軸側で異なる細胞分化を起こして向背軸に沿って非対称的な構造となってゆく。このときどのような機構で成長方向が側方へ限定されるのか、また向軸側と背軸側で別々の特徴的な細胞分化を起こすのか、という問題についてはこれまでに様々な研究がなされてきた。特に、以下で述べる通りシロイヌナズナや他のモデル植物において、側方への平面的な成長と、向背軸に沿った非対称な細胞分化を起こす上で重要な遺伝子群が同定され、その機能解析が進められてきた。

1-3. 葉の平面性と非対称性を与える上で重要な遺伝子

シロイヌナズナの葉原基が側方成長するために、また向軸側と背軸側での非対称な細胞分化を起こすためにも、必要な遺伝子としてよく知られているのが、葉原基の向軸側と背軸側で特異的に発現する複数の転写因子群である(図 2B)。こうした転写因子をコードする遺伝子のうち向軸側で発現するものとしては、3つの Class III HomeoDomain–Leucine Zipper (HD-ZipIII)ファミリータンパク質をコードする *PHABULOSA* (*PHB*), *PHAVOLUTA* (*PHV*), *REVOLUTA* (*REV*)と(以下、*PHB*様遺伝子と呼ぶ)、LATERAL ORGAN BOUNDARY (*LOB*)ドメインファミリーのタンパク質をコードする *ASYMMETRIC LEAVES2* (*AS2*)が知られている。一方背軸側で発現するものは4つの YABBY (*YAB*)ファミリータンパク質をコードする *FILAMENTOUS FLOWER/YABBY1* (*FIL*), *YAB2*, *YAB3*, *YAB5* と、3つの KANADI (*KAN*)ファミリータンパク質をコードする *KAN1*, *KAN2*, *KAN3* と、2つの AUXIN RESPONSE FACTOR (*ARF*)タンパク質をコードする *ETTIN/ARF3* (*ETT*), *ARF4* が挙げられる (Kidner and Timmermans, 2010; Efroni et al., 2010; Szakonyi et al., 2010; Yamaguchi et al., 2012)。

向軸側で発現する *PHB* 様遺伝子および *AS2* は、いずれも一つの遺伝子を葉原基全体で発現させただけで全体が向軸側様の性質を持つ針状の葉、あるいは大部分が向軸側様の性質の葉になる (McConnell and Barton, 1998; McConnell et al., 2001; Mallory et al., 2004; Lin et al., 2003; Xu et al., 2003)。また、これら向軸側で特異的に発現する遺伝子の一つだけを機能欠損した変異体は、葉の平面性や向背軸に沿った非対称性に大きな異常を示さない (Prigge et al., 2005; Xu et al., 2003) が、*phb rev* 二重変異体、*phb phv rev* 三重変異体や、*as2* 変異とその表現型を昂進する変異や薬剤処理との相加的効果によって、全体または広い範囲で背軸側様の性質を持つ葉が形成され、やはりこれらも針状または細い形態の葉となる (Emery et al., 2003; Prigge et al., 2005; Fu et al., 2007; Huang et al., 2006; Pinon et al., 2008; Yao et al., 2008; Yang et al., 2006; Nakagawa et al., 2012; Li et al., 2005; Ishibashi et al., 2012; Ueno et al., 2007)。

一方背軸側で発現するもののうち、*YAB* ファミリーの転写因子は、一つの遺伝子を葉原基全体で強く発現させると背軸側様の性質が全体ではないが広い範囲に見られる細い葉を形成し、針状の葉を形成する場合がある (Sawa et al.,

1999; Siegfried et al., 1999)。また *fil yab3* や *fil yab3 yab5* の機能欠損多重変異体は、細いまたは針状の葉を形成し、向軸側様の性質と背軸側様の性質が入り交じったような、向背軸の非対称性が失われた葉を形成する(Siegfried et al., 1999; Stahle et al., 2009; Sarojam et al., 2010)。KAN ファミリーの転写因子は、一つの遺伝子を葉原基全体で強く発現させただけで、全体が背軸側細胞様の性質を持つ針状の葉になる(Kerstetter et al., 2001; Eshed et al., 2001; Eshed et al., 2004)。また *kan1 kan2* や *kan1 kan2 kan3* の多重変異体の葉は向軸側様の性質が広い範囲に見られ、細く突起のある形態となる(Eshed et al., 2001; Eshed et al., 2004)。*ETT* と *ARF4* はそれらを単独で葉原基全体で発現させると野生型の葉とあまり変わらない葉、または *as2* 変異体様の葉が形成される(Pekker et al., 2005; Fahlgren et al., 2006; Hunter et al., 2006)が、これらを機能欠損させた *ett arf4* 二重変異体は *kan1 kan2* とよく似た細く突起のある葉を形成する(Pekker et al., 2005)。また、これらの ARF タンパク質は KAN ファミリーの転写因子とタンパク質複合体を形成して転写制御機能を発揮していると考えられている(Kelley et al., 2012)。

向軸側と背軸側でそれぞれ発現する転写因子群に加えて、一部の低分子 RNA も向軸側または背軸側の領域で特異的に活性を持ち、重要な働きをしていることが知られている。microRNA の一種 microRNA165/166 (miR165/166)は *PHB* 様遺伝子の mRNA との相補的な配列を持ち、これらの mRNA と結合、切断する(Mallory et al., 2004)。*PHB* 様遺伝子の転写は葉原基の広い範囲で起きているが、miR165/166 が背軸側で特異的にこれらを発現抑制するため、向軸側でのみ発現すると考えられている(Kidner and Martienssen, 2004)。また、trans-acting small interfering RNA に属す RNA のうち tasiR-ARFs は、向軸側で活性を持ち、*ETT* と *ARF4* の mRNA との相補的な配列によってこれら mRNA を特異的に切断するので、向軸側での *ETT* と *ARF4* の発現を抑制している(Garcia et al., 2006; Chitwood et al., 2009)。

以上に見てきた向軸側と背軸側に特異的な転写因子および低分子 RNA の働きを短く言うと、向軸側で発現するものが向軸側の細胞分化を促し、背軸側の細胞分化を抑える、一方背軸側で発現するものが背軸側の細胞分化を促し、向軸側の細胞分化を抑えると言える。また、向軸側の細胞分化を運命付けられた細胞群と背軸側の細胞分化を運命付けられた細胞群が両方とも葉原基内に存在することで、それらが隣接している付近で側方への器官成長が起こると考えら

れている(Waites and Hudson, 1995)。つまり、葉の平面的で非対称な形態がどのように形成されるかを解明する上で、これらの遺伝子の発現パターンを制御する仕組みを理解することが欠かせない。

1-4. 葉原基において向軸側と背軸側に特異的な遺伝子発現を制御する既知の仕組みと問題点

上記の葉原基の向背軸に沿った遺伝子発現パターンがどのように制御されているのかという問題については、現在までにさまざまな研究と議論がなされてきた。中でも特に重要な制御機構と考えられているのは、向軸側で発現する遺伝子は背軸側で発現する遺伝子によって発現抑制され、逆に背軸側で発現する遺伝子は向軸側で発現する遺伝子によって発現抑制される、という相互抑制関係である。この相互抑制の重要性は当初 Eshed らによって提唱され(Eshed et al., 2001)、現在までに多くの研究者によって支持されている(Kidner and Timmermans, 2010; Efroni et al., 2010; Yamaguchi et al., 2012; Byrne, 2012)。この相互抑制関係は、転写因子が別の遺伝子の転写を直接抑制するというもの(Wu et al., 2008)と、低分子 RNA が標的 mRNA と相互作用して切断するというもの(Kidner and Martienssen, 2004; Chitwood et al., 2009)がよく解明されているが、その他別の因子を介した間接的な転写抑制や活性抑制も数多く存在すると見られており、向軸側と背軸側の遺伝子群全体で複雑な制御ネットワークをなしていると考えられている(La Rota et al., 2011)。

この相互抑制関係によって容易に導かれる帰結は、一つの細胞が向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の両方を同時に強く発現することができず、一方の遺伝子群しか発現できないということである。これは実際に向軸側の細胞は向軸側特異的な遺伝子群のみを発現し、背軸側の細胞は背軸側特異的な遺伝子群のみを発現するという事実に大きく矛盾しない。しかし、この相互抑制によって説明できない問題点が二点挙げられる。

一点目は、およそ P0 期から P1 期にかけて、向軸側と背軸側に特異的な遺伝子発現パターンが葉の発生過程で初めて見られるようになる頃(Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999; McConnell et al., 2001; Eshed et al., 2001; Kidner and Martienssen 2004; Pekker et al., 2005; Iwakawa et al., 2007; Chitwood et al., 2009)、どのようにして向軸側と背軸側という方向性が規定されるのかという問題である。言い換えるなら、なぜ向軸側の遺伝子発現領域が

90°ずれて横を向いたり、180°ずれて本来の背軸側になってしまったりしないのかという点である。二点目は、どうやって遺伝子発現領域が向軸側と背軸側に二分されるのかという問題である。たとえば境界線が波打ったり斑状に二領域が入り組んだりしないのは何故だろうか。同様の問題は、例えばハエの翅の発生研究においてすでに注目され、実際にハエの翅原基の腹側と背側の細胞集団がほぼ直線的な境界をはさんで分かれ、両方の細胞集団が入り混じらないための機構が明らかにされてきている(Becam et al., 2011; Aliee et al., 2012)。以上二点の問題点が解決されなければ、葉原基の向背軸に沿った遺伝子発現パターンを制御する仕組みを理解できたとは言えない。

一点目に答える仮説として、P0 期頃の葉原基において、茎頂分裂組織の細胞に由来する何らかの移動性の因子が茎頂分裂組織に近い側の細胞（つまり向軸側の細胞）にのみ影響を与えて、向軸側に特異的な遺伝子発現を促す、または背軸側のそれを抑制するというモデルが提唱されており、その移動性因子の候補も知られてきている(Reinhardt et al., 2005; Toyokura et al., 2011)。一方二点目は、相互抑制が細胞自律的に起こるだけでなく、周囲の細胞にも非自律的に抑制的な作用が起こるなら、ある程度疑問は解消されそうである。つまり、もしも向軸側特異的な遺伝子発現を示す細胞はその細胞内だけでなく周囲の細胞での背軸側特異的な遺伝子群の発現を抑制する作用を持つなら、そして逆に背軸側特異的な遺伝子発現群を発現する細胞が周囲の細胞での向軸側特異的な遺伝子発現を抑制するのなら、ある細胞の遺伝子発現状態は周囲の多くの細胞の遺伝子発現状態に感化されるはずなので、二つの遺伝子発現領域がまとまった領域に分かれることはある程度説明できる。実際にこのような細胞非自律的な抑制作用というのはいくつか知られている。例えば低分子 RNA である miR165/166 と tasiR-ARFs は転写される細胞から周囲の細胞にまで細胞間を移動して作用することが知られている(Chitwood et al., 2009; Carlsbecker et al., 2010; Miyashima et al., 2011)。また、KAN 遺伝子群が PHB 様遺伝子群の発現を抑制するときには植物ホルモンである auxin を介していることが示唆されている(Ilegems et al., 2010)、PHB 様遺伝子群が miR165/166 の産生を抑制するときには植物ホルモンの cytokinin を介していることが知られている(Dello Ioio et al., 2012)。これらの植物ホルモンも細胞間を拡散し、または輸送されて作用することから、やはり細胞非自律的に作用するものと考えられる。

しかし、この細胞非自律的な遺伝子間の相互抑制を考えると、二つの遺伝

子発現領域が混じり合ったりせずに分かれるという事実を理解しやすい一方で、別の疑問が生じる。それは遺伝子発現領域の境界付近の細胞はなぜ一方の遺伝子発現状態から他方の発現状態へと切り替わってしまわないのか？という疑問である。この疑問はこれまでの先行研究において深く追究されたことがないが、向背軸に沿った遺伝子発現パターンの制御機構を理解するためには無視できない問題となりうる。

実は、この細胞の遺伝子発現状態がなぜ切り替わらないのかという疑問を考える前に、そもそも遺伝子発現状態は葉の発生中に切り替わるのか否かという点は厳密に示された例が無い。それにもかかわらず、向軸側と背軸側に特異的な遺伝子発現領域は葉の発生初期に形成されて、その後維持される、と便宜的に明記または示唆する記述がなされてきた(Kidner and Timmermans 2010; Efroni et al., 2010; Yamaguchi et al., 2012; Byrne, 2012)。一方で、次節で述べる通り背軸側特異的な遺伝子発現領域のサイズが葉の発生途中で変化することがいくつかの研究から報告されてきている。そこで本研究では、向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の発現状態が個々の細胞で維持されているのか、何らかの変化をするのか、という点をまず明らかにし、さらにその維持または変化の過程がどのように制御されているかという点を解明することを目指した。

1-5. *FIL* と *PHB* 様遺伝子の発現パターン

本研究では向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の発現領域のうち、向軸側特異的な *PHB* 様遺伝子群の発現領域 (miR165/166 活性の低い領域と同様のものと見なす) と背軸側特異的な *FIL* の発現領域に注目して解析を行う。その理由は、向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の中でも特にこの二つの発現領域は複数の先行研究によって詳しく観察され、二領域がほとんど重ならず、あるいはわずかな重なりをもって、向軸側と背軸側に別れている様子が知られているからである。この二つの領域が向軸側と背軸側に分かれている様子は、葉原基 (Toyokura et al., 2011)だけでなく、それと相同な存在と考えられる子葉原基 (Gillmor et al., 2010)やガク片原基 (La Rota et al., 2011)、また相同ではないが花芽原基 (Heisler et al., 2005)についても報告されている。さらに、この二領域が同様に分かれているという観察結果は、シロイヌナズナ (*Arabidopsis thaliana*)だけでなくキンギョソウ (*Antirrhinum majus*)やハゴロモモ (*Cabomba caroliniana*)のホモログ遺伝子の解析 (Golz et al., 2004; Yamada et al., 2011)から

も、報告されている。これらの報告は、*PHB* 様遺伝子群と *FIL* の向軸側と背軸側における特異的発現パターンが、広範な植物の葉や他の器官において向背軸に依存した形態形成が起こるために共通な分子基盤であることを示唆している。

一方で、*FIL* の発現領域サイズが葉の発生の進行とともに変化するという報告もある。たとえば、シロイヌナズナの葉は向背軸に沿っておよそ 6 細胞層(1 層の向軸側表皮、4 層の葉肉、1 層の背軸側表皮からなる)の層構造を持つ中で、*FIL* は P0 期には葉原基形成予定領域の全細胞で発現するように見えるが、P1 期以降では葉原基の背軸側 4 細胞層程度に限定されるという記述がある(Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999)。さらに P6 期前後には背軸側 3 細胞層にまで限定されるという記述もある(Nakata et al., 2012)。また、本研究の直接的な基盤となる先行研究からも、葉原基断面で *FIL* の発現領域サイズの割合を測定すると、若い葉原基よりも成長の進んだ葉原基において割合が低いことがわかっている(爲重 2009 修士論文)。ただし、このように *FIL* 発現領域が限定されてゆくのが、*FIL* を発現していた細胞が発現を止めてゆくためなのか、あるいは発現していない細胞が相対的に速く増殖するためなのかは不明であった。また、向軸側の *PHB* 様遺伝子の発現領域が同時に広がるのかどうか、という点も明らかでない。

これらの点を明らかにした上で、それらの発現領域の維持または変化の過程を制御する機構に迫ることができれば、それは本研究の目標である「葉の平面的な形態と向背軸に沿った非対称性を生み出す仕組みの解明」へ向けての重要な前進になるはずである。

1-6. 本研究における課題とアプローチ

本研究では *FIL* の発現領域をマーカー遺伝子 *FILpro:GFP* (Watanabe and Okada, 2003)によって可視化し、*PHB* の発現領域を *miR165/166* 活性の無い、または低い、領域のマーカー *35Spro:miYFP-W* (Toyokura et al., 2011)によって間接的に可視化して葉の発生段階を追って詳細に観察した。結論から述べると、P0 期頃の葉原基では、全ての細胞で *FIL* 発現と *miR165/166* 活性が見られるが、その後向軸側の細胞から順に *FIL* の発現と *miR165/166* の活性が抑えられ、*PHB* を発現するように切り替わってゆくという、新たな *FIL* と *PHB* の動態が明らかとなった。

そこで、この *FIL* の発現を止めて *PHB* の発現をするように切り替わる過程

が野生型よりも遅れて進行する変異体と速く進行する変異体を同定し、解析を行った。その結果、この切り替わりのタイミングは *PHB* の発現レベルそのものによって制御されることがわかった。また、プラスチドに異常を示す変異体 *enlarged fil expression domain2 (enf2)* などを用いた解析から、この切り替わりはプラスチドゲノムの遺伝子発現活性が低下したときに遅くなるという現象を見出した。さらに、このプラスチドの関わる *FIL* と *PHB* の発現動態の制御は、*GENOMES UNCOUPLED1 (GUN1)* という遺伝子機能に依存して起こる制御であることを見出した。*GUN1* とはプラスチドの状態に応じて、光合成などに関わる核遺伝子の発現を制御する上で必須の因子としてよく知られている (Woodson and Chory 2008; Pogson et al., 2008; Larkin and Ruckle, 2008; Pfannschmidt, 2010; Inaba et al., 2011)。これらの結果は、プラスチドの機能がどのようにして葉の形態形成に関与するかという、以前から議論されて来た謎の多い問題の一部を解明するものである。

最後にこの *FIL* と *PHB* の発現動態を模倣する単純なモデルを構築し、このモデルの振る舞いを計算機シミュレーションによって実際の観察と合うかどうか検討した。このモデルは現時点で仮説に過ぎないので、第四章考察の一部として記載するが、今後取り組むべき課題を提示するという点で、関連分野の今後の研究に貢献しうるものと考えられる。

第二章 材料と方法

2-1. 植物材料

本研究で実験に用いた植物はすべてシロイヌナズナ(*Arabidopsis thaliana*)である。野生型として用いたのは当研究室で使われてきた *Colombia* (Col)株、またはこれに *FILpro::GFP 35Spro::miYFP-W* のマーカー遺伝子等を導入した植物である。

FILpro::GFP (*FIL* 遺伝子の翻訳開始点から 5'上流-6011bp のプロモーターで、小胞体局在型 GFP を発現するマーカー; Watanabe and Okada, 2003)、*PHBpro::YFP* (*PHB* 遺伝子の翻訳開始点から 5'上流-3754bp までのプロモーターで、小胞体局在型 YFP を発現するマーカー; 渡辺 2003 博士論文)、*35Spro::miYFP-W* (小胞体局在型 YFP のコーディング配列に miR165/166 の認識配列を付加し、これをカリフラワーモザイクウイルス *35S* プロモーターで発現するマーカー; Toyokura et al., 2011)は当研究室で渡辺恵郎博士によって作製されたものを用い、変異体への導入は交配によって行った。

突然変異体 *enf2* (*enf2-1 ene* 二重変異体および各々の単一変異体)は渡辺恵郎博士のスクリーニングと爲重による戻し交配によって単離された変異体である。(渡辺 2003 博士論文; 爲重 2009 修士論文)。突然変異体 *enf2-2* (SALK_063761), *phb-13* (Prigge et al., 2005), *flv*, *sus2-4*, *sus2-5*, SAIL_165_F07, SALK_054291 の種子は *Arabidopsis* Biological Resource Center (ABRC, 米国)から取り寄せた。突然変異体 *phb-1d* (McConnell and Barton, 1998)と *rev-6* (Otsuga et al., 2001)は J L Bowman 教授 (モナシュ大学, オーストラリア)から頂いたもので、*L.er* 背景の変異体であるが、当研究室において Col 背景の野生型植物と 4 回以上戻し交配したものを用いた。突然変異体 *gun1-1*, *gun5-1* の種子は望月伸悦博士(京都大学)から頂いた。各々突然変異体の遺伝子型を確認する際には表 1 のプライマーと検出方法で行った。

2-2. 植物の生育

植物種子の滅菌は、70%エタノールに 3 分間浸した後、10%ブリーチ(キッチンハイター、花王、東京都)に 0.01% Triton-X100 を加えた液中で 10 分間振盪し、純水で 4 回置換洗浄し、純水に浸したまま 4℃暗所下で 2 日吸水させてから、寒天培地上に播種した。寒天培地の組成は水溶液 2 L につき、ムラシゲ・スクー

グ培地用混合塩類 1 L 用(日本製薬, 東京都)を 1 袋、mio-inositol (10 mg/ml)を 10 ml、Thiamin-HCl (2 mg/ml)を 200 μ l、MES-KOH (5%(w/v), pH5.7)を 20 ml、sucrose を 20 g、purified Agarose を 20 g、を含む。これをオートクレーブしてからプラスチックシャーレに分注し、冷まして固めてから用いた。

特に指定しない限り、試薬はナカライテスク (京都府)または和光純薬工業 (大阪府)の製品を用いた。純水には Milli-Q 装置(Merck Millipore, 米国)で製造した超純水を用いた。

培地にデキサメタゾン(DEX, 終濃度 10 μ M), リンコマイシン, エリスロマイシン, ノルフラゾンを加える場合には、これらを 100%エタノールまたは純水に溶かして-30°Cで保存しておいたものを用いた。これらの試薬液は同寒天培地をプラスチックシャーレに分注する直前に添加し、よく混ぜて分注した。各々の終濃度は本文および図表中に記載した。播種後の芽生えを DEX 処理する場合は、標準培地上で生育した芽生えを 50 μ M DEX 水溶液に浸し約 5 分置いてから、DEX を含む寒天培地上に移して引き続き生育させた。

寒天培地上の植物は、特に断らない限りグロースキャビネット(三洋電機, 大阪)または BIOTORON(日本医化器械製作所, 大阪府)の中、22°C、24 時間白色光下(約 60 μ mol m⁻² s⁻¹)で生育させた。ただし、暗所で生育させる場合はアルミフویلで二重に包んで同グロースキャビネット等に入れて育てた。変異体 *phb-1d/+* は安定した表現型を示す 16°Cで生育させた。

栽培用土壌にはバーミキュライト GL(ニッタイ株式会社, 大阪府)を用い、プラスチックポットに入れてその上に播種、または寒天培地上から芽生えを移植した。これらは基礎生物学研究所の人工気象室(24 時間照光, およそ 22°C)にてそれぞれ生育させた。栄養分としてはハイポネックス(ハイポネックスジャパン, 大阪府)を与えた。

2-3. 掛け合わせ

雌親とする植物の花からは受粉前の段階で雌ずい以外の花器官をピンセットで取り除いた。雄親とする植物の花からは開裂した雄ずいを摘出して、雌親の柱頭に接触させ、受粉させた。

2-4. 次世代シーケンサーによるゲノムリシーケンス

野生型と *enf2* 交配し、得られた F2 世代の植物 16 個体から *enf2* の表現型(葉

の切れ込みと淡緑色)を示す個体を選抜し、地上部全組織からゲノム DNA を抽出した。用いたシーケンサーは基礎生物学研究所の生物機能情報分析室において SOLiD4™ (Life Technologies, 米国)である。ゲノム DNA の抽出は DNeasy Plant Mini Kit (株式会社キアゲン, 東京都)を用い、その後のライブラリ調整とシーケンス反応は Life Technologies 社の推奨プロトコールに従って行った。

2-5. 実体顕微鏡による観察

実体蛍光顕微鏡による VENUS 蛍光観察には GFP フィルタを組み込んだ SZX16 (オリンパス株式会社, 東京都)を用いた。蛍光像の撮影は CCD カメラ DP72 (オリンパス株式会社, 東京都)を用いた。この RGB カラー画像のファイルからグリーンチャンネルの像を抽出し、imageJ (<http://rsb.info.nih.gov/ij/>)を用いて VENUS 蛍光の見られる領域サイズを測定した。白色光下での芽生えの撮影は同じ実体顕微鏡とカメラを用いて行った。

2-6. 共焦点レーザースキャン顕微鏡による観察

共焦点レーザースキャン顕微鏡による観察には LSM510META(Carl Zeiss、ドイツ)を用いた。GFP 及び YFP (または VENUS)の蛍光を観察する際は 488 nm、クロロフィル蛍光を観察する際は 543 nm、の励起レーザーを照射した。蛍光の検出には λ モードで波長別の光強度データを取得した後、同顕微鏡システムに付属のソフトウェアに従い、GFP と YFP の蛍光を linear unmixing の計算によって分離した。また、同顕微鏡で微分干渉顕微鏡(DIC)像も必要に応じて撮影した。

FIL の発現領域の断面積及び葉原基の断面積は、画像データをもとに imageJ を用いて測定した。

茎頂付近の断面観察の際は、植物体を 6.5～7%の L.M.P. agarose (Life Technologies, 米国)に包埋した後、切片を作製してスライドガラス上に置き、氷冷した水を垂らし、カバーガラスを乗せて観察した。このアガロース切片の作製時はビブラトーム・振動式マイクロスライサー Leica VT1000S (Leica, ドイツ)を用いて、氷冷したまま 50～100 μ m の厚さに切った。

2-7. 走査型電子顕微鏡による観察

走査型電子顕微鏡には、Philips XL シリーズ走査電子顕微鏡 Ver 5.24 (フィリップス エレクトロン옵ティック株式会社, 東京都)を用いた。ステージ上には木工用ボンドを滴下し、その上にサンプルを置いて、液体窒素で一分間冷却し、凍結したものを観察した。葉の断面を観察する場合には液体窒素で凍結した葉をピンセットで割ってから観察した。

2-8. 透過型電子顕微鏡による観察

プレート上に播種後 2 週間育てた植物の本葉を、固定液 1 (4%パラホルムアルデヒド、1%グルタルアルデヒド、0.05 M カコジル酸バッファー、pH 7.4) に浸け減圧浸潤させた後、これを固定液中で 1~2 mm 幅の小片に刻み 2 時間静置した。その後サンプルを固定液 2 (0.5%オスミウムテトロキシド、同カコジル酸バッファー) の中で 2 時間静置して固定を終えた。固定後のサンプルは同カコジル酸バッファーで洗浄した後、エタノールシリーズで脱水した。その後プロピレンオキシドで処理し、プロピレンオキシド-EPON 液(プロピレンオキシドと EPON resin の等量混合液) (EPON 812 resin; TAAB Laboratories, UK)の中で一晩静置した。これを EPON resin 中に包埋し、60℃で 48 時間かけて硬化させた。

超薄切片は Ultramicrotome (Leica, ドイツ)を用いて作製し、これを銅グリッド上に乗せた。観察前にこれを 4%ウラニル酢酸と 4%クエン酸鉛で染色した。観察には透過型電子顕微鏡モデル H-7600 (Hitachi, 東京都)を用いて、80 kV で撮影した。

2-9. DNA の抽出

遺伝子型を確認する場合などは、植物の葉または全体からゲノム DNA を抽出して PCR などに用いた。抽出操作には DNA 自動分離装置 PI-50 α (倉敷紡績株式会社, 大阪府)を用い、推奨プロトコールに従って抽出した。得られた DNA は TE 中に溶解して-30℃で保存した。

大腸菌及びアグロバクテリウムからのプラスミド DNA の抽出には Wizard SV+ miniprep kit (プロメガ株式会社, 東京都)を用い、推奨プロトコールに従った。DNA の保存は純水中または TE 中に溶解して-30℃で保存した。

2-10. ENF2 mRNA のスプライシング異常の解析

それぞれの植物について播種後 8 日の芽生え地上部を 30 個体分ずつ集め、液体窒素で凍結して破碎し、RNeasy Plant Mini Kit (株式会社キアゲン, 東京都)を用い、推奨プロトコールに従って total RNA を抽出した。逆転写反応は SuperScript III First Strand Synthesis System for RT-PCR (Life Technologies, 米国)を用いてランダムヘキサマーとオリゴ dT の混合物をプライマーとして推奨プロトコールに従った。この逆転写反応液をテンプレートとして 1 μ L 用い *ENF2* の 1 番エキソンと 4 番エキソンを標的としたプライマー(表 3)で PCR 反応を行った。このとき PCR の増幅反応が飽和するように 40 サイクルで PCR 反応を終えた。PCR 産物は通常のアガロースゲル電気泳動の他、2100 Bioanalyzer (Agilent, 米国)を用いたマイクロ流動電気泳動によってもピークパターンを解析した。

2-11. qRT-PCR による遺伝子発現レベルの定量

1,2 枚目本葉が約 500 μ m 長に達した芽生え(野生型:播種後 5.5 日, *enf2*:播種後 7 日)の子葉と胚軸を可能なかぎり実体顕微鏡下で切除し、その茎頂部サンプル 60 個から total RNA を RNeasy Plant Mini Kit を用いて推奨プロトコールに従って抽出した。逆転写は QuantiTect Reverse Transcription Kit (株式会社キアゲン, 東京都)を用いて推奨プロトコールに従って行った。定量的 PCR には QuantiTect SYBR Green PCR Kit (株式会社キアゲン, 東京都)を用いて表 3 のプライマーセットとともに PCR 反応を行った。データ収集と解析は Rotor-Gene Q (株式会社キアゲン, 東京都)と専用ソフトウェア Rotor-Gene 6000 series software 1.7 (株式会社キアゲン, 東京都)を用いて行った。内部標準遺伝子として *β 6TUBULIN* を用いたが *18S rRNA* も用いた場合にもほぼ同じ結果を得た。

2-12. DNA コンストラクトと植物への形質転換

コンストラクト作製のための PCR には KOD plus (東洋紡株式会社, 大阪府)を用いた。また、ベクターへクローニングしたものはその都度シーケンスにより内容を確認してから、次の操作に用いた。

ENE の相補性試験には約 10.5 kb のゲノム断片(*AT1G80070/SUS2* の開始コドンの上流 527 bp からストップコドン下流 498 bp を含む)を用いた。この断片は野生型から抽出したゲノム DNA を鋳型に PCR で増幅した。制限酵素 Acc65 I と Not I の認識配列を付加したプライマー(表 2)での PCR 産物をそれぞれの制

限酵素で切断し、pBluescript SK attB1/2 (pBluescript II SK+ (Agilent Technologies, 米国)を改変したもの)のマルチクローニングサイトにサブクローニングした後、GATEWAY Technology (Life Technologies, 米国)を用いて pDONR Vector (Life Technologies, 米国)に移し、さらにバイナリーベクター pGWB-NB1 (Toyokura et al., 2011)に移した。

FILpro:CRE-GR の作製においては、6,011-bp *FIL* promoter (Watanabe and Okada, 2003)と、CRE-GR コーディング領域および 35S terminator を含む配列(Anastasiou et al., 2007において pML518と記載されたベクターに由来する)をそれぞれ PCR プライマー(表 2)によって ApaI サイトを付加し、それぞれ pBluescript SK attB1/2 にクローニングした。その後 *FIL* promoter 断片を ApaI 処理で切り出し、CRE-GR の開始コドン直前の ApaI サイトにライゲーションで挿入して *FILpro:CRE-GR* を作製した。これをさらに GATEWAY Technology を用いてバイナリーベクター pGWB-NB1 に移した。

35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS のベクターは、これを含む既存のバイナリーベクター(ML988 として Anastasiou et al., 2007 に記載)をそのまま用いた。

FILpro:CRE-GR と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* はそれぞれ野生型に形質転換してホモ接合体を得たのち、両者を交配して得た F1 植物において DEX 処理を行い、その後 VENUS 発現パターンを解析した。野生型背景で解析に用いた *FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* の系統は *enf2* および *phb-1d/+*と交配してこれら変異体背景での解析に用いた。

各々のバイナリーベクターに移したコンストラクトはアグロバクテリウム (*Agrobacterium tumefaciens* ASE 株または C58C1 株)を用いた減圧浸潤法で植物に形質転換した。形質転換植物の選抜には、通常の寒天培地に選抜用薬剤と 200 mg/L クラフォラン(サノフィ株式会社, 東京都)を添加して、その上に播種し、選抜した。選抜用薬剤の種類と濃度は、BASTA 耐性で選抜する場合には 7.5 mg/L glufosinate ammonium (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京都)、カナマイシン耐性で選抜する場合には 20 mg/L Kanamycin sulfate (シグマ アルドリッチ ジャパン合同会社, 東京都)である。

2-13. その他の分子生物学的な解析

PCR 反応は特記しない限りポリメラーゼ ExTaq (タカラバイオ株式会社, 滋賀県)および付属のバッファー類を用い、推奨プロトコールに従って、GeneAmp PCR

system 9700 (Life Technologies, 米国)でサイクル反応を進めた。電気泳動には LO3 アガロース(タカラバイオ株式会社, 滋賀県)または Nusieve アガロース (Lonza Rockland, 米国)を用いた。

DNA の配列決定には、BigDye Terminator Cycle Sequencing Ready Reaction Kit ver. 3.1 (Life Technologies, 米国)と 3130 Genetic Analyzer (Life Technologies, 米国)を用いて塩基配列を決定した。PCR 産物の配列決定には、MinElute (株式会社キアゲン, 東京都)で PCR 産物を精製したものを BigDye 反応に用いた。

DNA の配列データの解析には sequence analysis ver.3.0 (Life Technologies, 米国)および GENETYX (株式会社ゼネティックス, 東京都)を用いた。

2-14. 数理モデルと計算機シミュレーション

数理モデルの相平面プロットと計算機シミュレーション、計算結果の画像表示は Mathematica 7.0 (Wolfram Research, 米国)ソフトウェアを用いて行った。

モデル中の関数 f_1 と f_2 のヒル係数は 2、関数 g_1 と g_2 のヒル係数は 1 としてモデル化した。これは関数 f が AB と AD の転写抑制を想定しているため、転写因子が転写制御をする場合に二量体以上の複合体を形成して働くのが一般的だからである。また関数 g は miRNA または tasiRNA による mRNA 分解を想定したもので、この反応は通常一対一の反応だからである。しかしここでは、多種類の遺伝子産物を AD, AB という二つの因子の振る舞いとして単純化して扱っているので 2 次と 1 次のヒル式を用いる必然性はあまりない。なお、ヒル係数を 3, 4, 5 などに設定しても類似の結果を得ることを確認している。

シミュレーションの逐次計算では時間の刻み幅を $\Delta t=0.2$ として行い、4 次のルンゲクッタ法によって計算した。最も向軸側と背軸側の細胞では境界条件として反射を仮定した。

第3章 結果

3-1. 野生型における *FIL* と *PHB* 発現領域の変化

3-1-1. *FIL* 発現領域の縮小と *PHB* 発現領域の拡大

FILpro:GFP を発現する植物を茎頂横断面で観察し、葉原基全体とその内部の *FILpro:GFP* 発現領域の断面積を計測すると、成長の進んだ大きめの葉原基ほど *FILpro:GFP* 発現領域の割合が低いことが示されていた(Toyokura et al. 2011; 為重 2009 修士論文; 図 3A)。そこで、*FIL* の発現領域と同時に *PHB* 様遺伝子の発現領域も発生の進行に伴って変化するのかどうか調べるため、*FILpro:GFP* (Watanabe and Okada, 2003) の GFP 蛍光と、*PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro:miYFP-W* (Toyokura et al., 2011) の YFP 蛍光を、茎頂の横断面と縦断面で共焦点レーザー顕微鏡によって観察した。

まず茎頂分裂組織の側方の膨らみとして葉原基が確認できる直前頃の段階(P0 期)では、*FILpro:GFP* の発現は見かけ上葉原基予定領域全体に及んでいて、残りの茎頂分裂組織の細胞では発現が検出できない(図 3B, C)。一方 *35Spro:miYFP-W* の発現は、茎頂分裂組織の広範な領域で発現が見られるが、この *FILpro:GFP* 発現領域では発現が検出できないか、あるいは周りの細胞より発現が弱い(図 3B, C)。しかしここでは、継時観察や茎頂分裂組織のマーカー遺伝子の観察を行っていないので、葉原基予定領域と残りの茎頂分裂組織の細胞を厳密に見分けることができなかった。

次に、膨らみとして確認できる最も若い葉原基(約 20 μm 長、P1 期)では、まだ向背軸に沿って 6 細胞から成る層構造が見られないが、大部分の細胞が *FILpro:GFP* を発現し、*35Spro:miYFP-W* の発現が見られなかった(図 3D)。しかし、向軸側中央付近の表皮数細胞に限っては、*FILpro:GFP* の発現が見られず、*35Spro:miYFP-W* の発現が見られた(図 3D)。

さらにわずかに成長の進んだ葉原基(50 μm 長、P1 期から P2 期)では、葉原基は未だ半球形から円柱形であり、扁平な形態をしていないため葉の厚みの細胞層数を数えにくい(図 3E, F)。しかし図 3E, F のように、向背軸に沿って 6 細胞層の厚みのある部分で数えると、およそ背軸側 4 から 5 細胞で *FILpro:GFP* が発現し、向軸側 1 から 2 細胞で *35Spro:miYFP-W* が発現していた。境界に位置する 1 細胞程度で両マーカー遺伝子の重複した発現が観察されたが、それ以

外の細胞では、どちらか一方のみの特異的発現が観察された(図 3E, F)。

150 μm 長程度(P3 期から P4 期)の葉原基では、葉身らしい領域が側方へ扁平に成長を始めており、向背軸に沿って 6 細胞層程度の厚みがある。この段階では *FILpro:GFP* の発現領域は基部側で 3 から 4 細胞層、先端側で 2 から 3 細胞層になっており、*35Spro:miYFP-W* の発現はそれとわずかに重複しながら残りの向軸側細胞で見られた(図 3G, H)。このとき葉原基の周縁部表皮においては、50 μm 長程度の葉原基では先端の細胞より向軸側でまで *FILpro:GFP* が発現していた(図 3E 矢じり)のに対し、150 μm 長程度の葉原基では先端の細胞より向軸側では *FILpro:GFP* の発現が見られなかった(図 3G 矢じり)。

さらに発生の進んだ 300 μm 長程度(P6 期前後)の葉原基では、*FILpro:GFP* の発現領域は基部側でおよそ 3 細胞層、先端側で 1 から 2 細胞層になっていた(図 3I-L)。ここでも *35Spro:miYFP-W* の発現は残りの向軸側細胞層で見られ、*FILpro:GFP* と 1 細胞層程度で発現の重複が見られた(図 3I-L)。また葉原基の周縁部表皮においては、頂端側の先端で *FILpro:GFP* が発現し、それより向軸側では発現していない(図 3I, J 矢じり)が、基部側では先端の細胞とそれより向軸側の細胞でも *FILpro:GFP* の発現が見られた(図 3L 矢じり)。このとき、頂端側の先端部表皮では細胞が肥大伸長し、葉の周縁に特徴的な長い細胞へ分化し始めているが、基部側では先端の細胞もまだ小さく分化が進んでいない(図 4A-D 矢じり)。

1,000 μm 長以上の葉では、中肋付近を除いて 6 細胞程度の厚みのある葉身の中で背軸側 1 から 2 細胞層程度が *FILpro:GFP* を発現し、残りの 4 から 5 細胞層程度が *35Spro:miYFP-W* を発現していた(図 4F-J)。このとき周縁部の表皮は、基部の一部を除くほぼ全周にわたって先端の細胞が伸長しており(図 4E 矢じり)、同時に *FILpro:GFP* の発現はこれら先端の伸長している細胞で発現するがそれより向軸側では発現していなかった(図 4F-J 矢じり)。ただし、このような 500 μm 長を超す発生段階の葉では、発生が進むほど *FILpro:GFP* の発現レベルが葉全体で低下して GFP 蛍光のシグナル／ノイズ比が低下してしまうため、*FILpro:GFP* 発現細胞とそうでない細胞の区別が次第に難しくなっていった。一方 *35Spro:miYFP-W* の発現レベルは *FILpro:GFP* の場合のように低下しなかったが、この YFP マーカーは miR165/166 の活性が無い、あるいは低い領域を可視化するものであり、問題にすべき *PHB* 様遺伝子の発現レベルが維持されていることを必ずしも意味しない。そこで *PHB* の転写活性を示す指標である

PHBpro::YFP の発現についても、いくつかの発生段階で観察を行った。茎頂分裂組織や比較的小さな葉原基で *PHBpro::YFP* の発現がはっきりと確認でき、葉原基の中では背軸側の少数の細胞を除いて広い範囲で発現していた(図 5F)。しかし、500 μm 長を超す段階の葉原基では、発生が進むほど葉全体で発現レベルが低下していった(図 5A-E)。

以上の観察結果をまとめると、葉の発生開始時から、少なくとも 300 μm 長程度に達するまでの期間を通じて、*FIL* の発現領域は初めほぼ葉原基全域に渡っていたのが縮小し、反対に *PHB* 様遺伝子の発現領域はそれに伴って向軸側から広がってゆくことがわかった。そしてこの変化は向背軸に沿って向軸側から背軸側方向に進行すると同時に、表皮層内でも中央側から周縁側方向へ向かって進行しているようであった。その後さらに葉原基が大きく成長してくると、二つの発現領域サイズの縮小と拡大はいくらか進んでいるようだが、あまり大きくは変化していないようであった。こうした葉の発生初期の両発現領域のサイズ変化から、向軸側の細胞から順に、*FIL* の発現と *miR165/166* の活性を止めて *PHB* 様遺伝子を発現するように個々の細胞状態が切り替わっていることが強く示唆された。この現象は、これまでの向背軸に沿った遺伝子発現領域の研究において注目されて来なかったものであり、葉の発生に関する重要な発見である。

3-1-2. *FIL* 発現細胞の系譜追跡系の構築

前節での観察から、初期の葉原基の細胞においては *FIL* 発現状態から *PHB* 様遺伝子の発現状態への切り替わりが起きていることが示唆された。しかしこれは、さまざまな発生段階の葉原基を切片にして観察した状況証拠から導かれた考察であるため、より厳密に示すには葉原基のライブイメージングなど、直接的な根拠が必要である。

そこで次に、発生に伴い *FIL* の発現が向軸側細胞から順に抑制されるかどうかを別の方法で調べるため、近年細胞系譜の追跡に利用されているデキサメタゾン(DEX)誘導型 CRE リコンビナーゼ(CRE-GR)を用いて、*FIL* 発現細胞の系譜を追跡する実験系を構築した(図 6A)。この CRE-GR とは、配列特異的な DNA リコンビナーゼである CRE とグルコルチコイド受容体ドメイン(GR)を融合させることで、DEX 処理された場合にのみ CRE-GR が核内に移行し、DNA 上の標的配列 *loxP* と結合して組換え反応を起こすものである(図 6A)。今回構築し

た実験系は、*FIL* プロモーターによって *CRE-GR* を発現する *FILpro:CRE-GR* とともに、*35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* というコンストラクトを用いることで、DEX 処理の時点から後の *FIL* 発現細胞の系譜を追うシステムになっている(図 6A)。*35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* では、カリフラワーモザイクウイルス *35S* プロモーターの下流に *loxP* が転写ターミネータ配列(*Ter*)を挟んで2ヶ所あるため、このままでは蛍光タンパク質 *VENUS* を発現しない。ただし、2ヶ所の *loxP* の直後に小胞体局在型 *VENUS* の ORF を連結してあり、*CRE* によって *loxP* 間で DNA 組換えが起こると *35Spro:VENUS*(厳密には *35Spro:loxP-VENUS*)遺伝子が形成され、その細胞は以後構成的に *VENUS* を発現するようになる(図 6A)。つまり、DEX 処理時点で *FIL* を発現していた細胞は、その後 *FIL* の発現を止めたり、細胞が分裂、分化したりしても *VENUS* 蛍光によって以前 *FIL* を発現していたことが確認できる。

まずこの *CRE/loxP* 組換えの細胞特異性を確認するため、*FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* を持つ形質転換植物を播種時から恒常的に DEX 処理した。その結果、葉のほぼ全ての細胞で *VENUS* 蛍光が見られた(図 6B, E, F)のに対し、栄養成長期でも生殖成長期に入っても一貫して茎頂分裂組織では *VENUS* の発現は見られなかった(図 6B, C)。また花芽原基の背軸側半分程度で *VENUS* の発現が見られるものの、向軸側半分程度では *VENUS* の発現が見られなかった(図 6C)。この *VENUS* 発現パターンは、葉原基や花芽原基背軸側の細胞系譜はある時点で *FIL* が発現したが、茎頂分裂組織および花芽原基向軸側の細胞系譜では、発芽後一度も *FIL* を発現しなかったことを示している。このことは、本研究を含め以前から報告されて来た「*FIL* の発現が P0 期葉原基全体や P0 期花芽原基の背軸側で見られるが、茎頂分裂組織や花芽原基の向軸側では見られない」という観察事実と一致する(Toyokura et al., 2011; Gillmor et al., 2010; La Rota et al., 2011; Heisler et al., 2005; 図 6D)。つまり、*FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* が *FIL* 発現細胞を特異的に標識して、それ以外の細胞を標識しない実験系として機能していることを示している。

次に、*CRE/loxP* 組換えの DEX 依存性を確認するため、DEX 処理なしの生育条件で *FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* を持つ形質転換植物を育てた。その結果、*VENUS* の発現が葉の表側でも裏側でも斑点状に一部の細胞群で見られた(図 6G, H)。この DEX 無処理時の *VENUS* 発現は

35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS のみを有する植物では見られなかったので *FILpro:CRE-GR* によって *loxP* で組換えが起きたものと考えられた。その原因としては、葉の発生過程の途中で一定量の CRE-GR タンパク質が DEX 非依存的に核内へ拡散し、あるいは核膜の無い細胞分裂時などに、CRE-GR が DNA 上に会合して組換えを起こしたためであろうと推測される。この DEX 非依存的な VENUS 発現は、*FIL* の発現細胞系譜を DEX 処理の時点から追跡するという実験の目的上好ましくないノイズとなるが、ごく一部の細胞群でのみ見られた(図 6I)ことから、統計的に無視できると考えられた。

次に、DEX 処理なしで育てた *FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* 形質転換植物を DEX 処理した後早い時点で VENUS 発現パターンを観察することで、DEX 誘導後の VENUS 蓄積に要する時間を調べた。まず DEX 処理後 6 時間で葉原基を観察すると、点々と VENUS 発現細胞が見られた(図 6J)。これは、DEX 依存的な組み換えが偶然早く組換えが起こった細胞と、前述の DEX 非依存的組換えによる VENUS 発現細胞が見られたものと思われる。次に DEX 処理後 12 時間で観察すると、*FILpro:GFP* と似たパターンで VENUS の発現が見られた(図 6K)。このとき *FILpro:GFP* の GFP 蛍光よりも向軸側に 1 細胞程度広い範囲の細胞で VENUS 蛍光が見られる。この原因としては、DEX 処理時には *FIL* を発現していた細胞のうち、その後 12 時間以内に一部の細胞で *FIL* の発現が抑えられることが考えられる。またごく微量の CRE-GR タンパク質が *loxP* サイトの組換えを起こすことも考えられる。いずれにせよ、今回構築した実験系では、DEX 処理後 12 時間以内に、CRE-GR の核内移行、*loxP* サイトの組換え、VENUS 遺伝子の転写、翻訳そして VENUS タンパク質のフォールディングがほとんどすべての *FIL* 発現細胞で起きることが明らかになった。

3-1-3. 向軸側細胞から *FIL* の発現が抑制される時空間パターン

前節において実験系の実用性が確認できたので、次に前述の「葉の発生過程で向軸側寄りの細胞から次々に *FIL* の発現を抑制している」という点を裏付けるため、葉の発生のさまざまな段階から DEX 処理を行い *FIL* 発現細胞の系譜を追跡してみた。なおここでは、当研究室の標準生育条件において発生スケジュールがよくわかっている 3 枚目本葉に注目して解析を行い、VENUS の発現パターンは主に葉の向軸側全面を蛍光実体顕微鏡で観察した。この観察方法で

は葉の中で最も明るく VENUS 蛍光が見える領域と弱く見える領域、全く見えない領域があるが、それぞれ向軸側表皮での発現領域、表皮は発現しないが向軸側第 1 層の葉肉での発現領域、それらのどちらでも発現していない領域に対応していた(図 7K-R)。

上述の通り播種時(0 日目)から DEX 処理を行うと葉のほぼ全ての細胞で VENUS が発現した(図 7A)。また一部の葉では、向軸側中央付近の一部の表皮を除いて残りの全細胞で VENUS の発現が見られた(図 7B)。この VENUS を発現しない向軸側表皮の細胞群は、*FIL* の発現パターンそのものに葉原基ごとの差が無いと仮定するなら、葉の発生開始時に短時間 *FIL* を発現していたが、CRE による組換え反応が起こる前に CRE の発現量がほとんどゼロになったものを示すと考えられる。3 枚目本葉の発生が始まっていない播種後 3 日目から DEX 処理した場合にも、VENUS 発現パターンは 0 日目の処理と同様であった(図 7C)。

しかし、播種後 4 日目以降で DEX 処理すると VENUS パターンに変化が現れた。3 枚目本葉が 20 ~ 50 μm 長(P1 期前後)である 4 日目から DEX 処理すると、VENUS の発現領域は 0, 3 日目での DEX 処理の場合より狭くなった(図 7J)が、それでも向軸側表皮の多くと向軸側第 1 層の葉肉の中央以外で広く発現していた(図 7D, K, N)。さらに処理を遅らせて 100 μm 長(P3 期)前後の段階である 5 日目、200 ~ 300 μm 長(P5 期)前後の 6 日目、400 ~ 500 μm 長(P7 期)前後の 7 日目、800 ~ 1,000 μm 長(P9 期)前後の 8 日目、のそれぞれから DEX 処理すると、図 2 の通り処理日が遅いものほど VENUS の発現領域は背軸側へ、側方基部側へ、と方向性を持って狭くなっていった(図 7D-H, J)。ここで、6 日目処理のものでは先端側半分では向軸側表皮でほとんど VENUS の発現が見られず、基部側半分ではまだ周縁あたりで向軸側表皮の VENUS 発現が一貫して観察された(図 7L, O, P)。この VENUS 発現パターンは、*FILpro:GFP* の 300 μm 長前後の葉原基での発現パターン(図 3J-L)とよく一致することから、CRE-GR による組換えが起こるのは DEX 処理時点で *FILpro:GFP* の GFP 蛍光が検出できる細胞と概ね対応していると考えられた。つまり、300 μm 長前後の葉原基の頂端側では細胞伸長している周縁部細胞を境に向軸側では *FILpro:GFP* は発現せず背軸側で発現していた(図 3I, 3J, 4A-D 矢じり)のに対し、基部側では同様の位置にある細胞よりも向軸側の表皮細胞でまで *FILpro:GFP* の発現領域が及んでいるように見えたからである(図 3L 矢じり)。さらに、8 日目からの DEX 処理では向軸側表皮と第 1 層葉肉からは VENUS の発現がほぼ見られなくなったが、

背軸側から観察するとほぼ全面で VENUS の発現が見られ(図 7D)、断面を観察すると背軸側 2 から 3 細胞程度で発現していることがわかった(図 7Q, R)。この VENUS 発現パターンも、相当する発生段階の *FILpro:GFP* の発現パターンとよく一致していた(図 4F-J)。

以上に見て来た *FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* による VENUS 発現パターンの変化から、葉の発生初期には *FIL* の発現細胞系譜が瞬時に決定されるのではなく、時間をかけて向軸側の細胞から次々に *FIL* 発現細胞から *FIL* を発現していない細胞(すなわち *PHB* 発現細胞)へと切り替わってゆくことが明らかになった。

3-2. *FIL* と *PHB* の発現動態に異常を示す変異体 *enlarged fil expression domain2 (enf2)* の解析

前節 3-1 で野生型における *FIL* と *PHB* の発現動態の観察結果から、*FIL* の発現と miR165/166 活性が次々に向軸側細胞から抑えられ、*PHB* が発現するように切り替わってゆくという、これまでに記述されて来なかった現象が明らかとなった。以下ではこの現象を *FIL* と *PHB* の発現領域境界の移動と呼び、これを制御しているメカニズムと、その重要性を理解してゆくために遺伝学的解析を行ったので、その結果を述べる。

3-2-1. *enf2* 変異体に関する既知の知見

当研究室で単離された変異体 *enlarged fil expression domain2 (enf2)* は、その名の通り葉原基の *FIL* 発現領域が野生型に比べて異常に広く見え、同時に *PHB* の発現領域が狭く見える変異体である(爲重 2009 修士論文; 図 8A, B)。この変異体では *FIL* 発現領域サイズが葉の発生開始後間もない頃(断面積 5,000 μm^2 以下、およそ P2 から P4 期程度に相当)には野生型とあまり明確には違わないのに対して、発生がある程度進行すると(断面積 10,000 ~ 15,000 μm^2 、およそ P6-P8 期に相当)野生型よりも明らかに大きいことが、図 3A と同様の *FILpro:GFP* 発現領域の面積データから分かっていた(爲重 2009 修士論文; 図 8C)。このことは、変異体 *enf2* において *FIL* と *PHB* の発現領域の境界が背軸側へ移動するのが野生型よりも遅いことを示唆している。

一方この変異体の成熟葉の形態は、野生型に比べて概ね幅が狭く細く(図 8I, J)、1%以下の低い頻度で葉全体または葉の一部が針状でトライコームの無い構造をした異常な葉を形成することが知られていた(爲重 2009 修士論文; 図 8K)。こうした細いまたは針状の葉の形態は、*35Spro:miR165* 形質転換体(Fu et al., 2007; Zhou et al., 2007; Li et al., 2005)、*35Spro:FIL* 形質転換体(Siegfried et al., 1999; Sawa et al., 1999)などの、背軸側組織様の性質が異常に広い範囲に及んでいるとされる植物の特徴と一致している。また *enf2* 変異体は葉肉細胞の分化にも明確な変化を生じることが知られていた。野生型の葉では向軸側第一層の葉肉は、柵状組織と呼ばれる向背軸方向に伸長した細胞が隙間なく並んだ構造を取り、残りの背軸側の葉肉は凹凸のある細胞が隙間をあけて配置された海綿状組織と呼ばれる構造を取る。一方、*enf2* の葉では、背軸側の海綿状組織は野生型とあまり変わらないように見えるが、向軸側第一層の葉肉の細胞間の隙間が大きく、柵状組織らしい伸長した細胞とともに凹凸のある海綿状組織らしい細胞がまばらに形成される(爲重 2009 修士論文; 図 8L, M)。この葉肉の分化異常もまた背軸側の性質が向軸側にまで及んだものと解釈することができる。

これら *enf2* の形態的表現型から、この変異体では *FIL* と *PHB* の異常な発現パターン、おそらくは両遺伝子発現領域の境界移動が遅いこと、が原因の一つとなって葉の形態異常、細胞分化異常を引き起こしている可能性が示唆されていた。

3-2-2. 変異体 *enf2* での *FIL* と *PHB* の発現領域の変化

変異体 *enf2* においても *FIL* と *PHB* の発現領域の境界が移動しているのか、これが野生型よりも遅く進行しているのかどうかを調べるため、*enf2* において *FIL* の発現マーカー *FILpro:GFP* と *PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro:miYFP-W* を同時に観察した。この変異体のいくつかの発生段階において、*35Spro:miYFP-W* と *FILpro:GFP* の領域が野生型同様ほぼ分かれていることが予備的に調べられていた(爲重 2009 修士論文)が、同等の発生段階で野生型と *enf2* を詳細に比較できるだけの観察データが不足していたため、発生段階を厳密にそろえて野生型との比較を行なった。まず、まだ半球形に近い形態の若い葉原基(50 μm 長、P1-P2 期)では、野生型と比較して *FILpro:GFP* 発現領域の面積にあまり明確な差はなく(図 3F, 8C, D)、またその *FILpro:GFP* 発現領域とごく僅かな重複を持って残りの向軸側細胞で *35Spro:miYFP-W* が発現してい

た(図 8D)。次に、150 μ m 長前後(P3-P4 期)の、横断面が三角形に近い形状の葉原基では、*FILpro:GFP* の発現領域面積が野生型よりも *enf2* で大きく、6 細胞層前後の厚みのある部分で比較すると、*FILpro:GFP* と *35Spro:miYFP-W* が野生型ではおよそ 3 細胞ずつで発現しているのに対し、*enf2* 変異体ではそれぞれ背軸側 4 細胞と向軸側 2 細胞程度で発現していた(図 3H, 8E)。さらに発生が進んで 300 μ m 長前後(P6 期前後)になった *enf2* の葉原基を観察したところ、先端では背軸側 2-3 細胞層、基部では背軸側 4 細胞層前後で *FILpro:GFP* が発現し、残りの向軸側で *35Spro:miYFP-W* が発現していた(図 8F-H)。この発現パターンを野生型のものと比較すると、やはり *enf2* では *FILpro:GFP* 発現領域が広く、*35Spro:miYFP-W* の発現領域が狭いことがわかる(図 3J-L, 8F-H)。

以上の結果から、変異体 *enf2* においても *FIL* と *PHB* の発現領域は境界を挟んで分かれたまま、葉の発生進行にともなって *FIL* の発現領域が相対的に縮小し、*PHB* 発現領域が相対的に拡大してゆく、つまり境界が背軸側へ移動してゆくという野生型と同様の変化が起きていることが明らかとなった。そして、その変化が野生型よりも遅れて進行していると考えられた。

3-2-3. *enf2* 変異体での *FIL* 発現細胞の系譜追跡

これまでの解析から、*enf2* においても *FIL* 発現細胞が次々にその発現を抑制する過程がおきていることが強く示唆されてきた。しかし、別の可能性として、*FIL* の発現抑制が起きずに向軸側細胞の分裂が速いことのみによって *PHB* 発現領域が相対的に広がっているという可能性も完全には否定できない。また *enf2* では葉の発生開始時(P0 期前後)から *FIL* 発現領域が野生型よりも広いのかどうか明確でなかった。そこでこれらの点をより詳細に調べるため、*FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* を *enf2* に導入して、上記の野生型の場合と同様の方法で *FIL* の発現動態を解析した。

まず *FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* を有する *enf2* を播種時および播種後 3 日目、4 日目から継続的に DEX 処理した場合、葉の全細胞、または向軸側中央付近の表皮を除くほとんどの細胞で VENUS を発現した(図 9A, B, J)。この VENUS 発現パターンは野生型において播種時および播種後 3 日目から DEX 処理した場合のパターンとよく似ており、野生型同様に *enf2* でも葉の発生開始時に全細胞で *FIL* の発現が引き起こされた直後、向軸側中央付近の表皮細胞(群)でその発現が抑制されると考えられた。なお、このときの

VENUS 発現領域の割合の平均は、向軸側の表皮で約 74%と第一層葉肉で約 97%であり、野生型でのそれらの割合(各々約 79%と 99%)に近い値であった(t 検定にて各々有意差無し: $p = 0.431 > 0.05$, $p = 0.129 > 0.05$; 図 9J)。このことから、*FIL* の発現開始後の最初の抑制までの時間と、その抑制が起こる細胞数に野生型と *enf2* であまり大きな差がないと推測された。

DEX 処理開始の時間をさらに遅らせて 5 日目から 10 日目まで 1 日おきに变化させると、VENUS 発現領域は葉身の側方側へ、背軸側へと限定されていった(図 9C-H, J)。10 日目からの DEX 処理では向軸側の表皮と第 1 層葉肉からは VENUS の発現がほぼ見られなくなったが、この葉を背軸側から観察すると全面で VENUS の発現が見られた(図 9I)。以上の DEX 処理のタイミングと VENUS 発現パターンの結果から、*enf2* の葉の発生過程においても、野生型と同様に、*FIL* を発現していた細胞が向軸側、中央側から順番にその発現を抑制してゆくことがわかった。

なお、ここで図 9J の通り横軸を DEX 処理開始日、縦軸を VENUS 発現領域の面積割合としてプロットすると、向軸側表皮と向軸側第一層葉肉のデータとともに、*enf2* の方が野生型よりも緩やかな傾きを示し、*FIL* の発現が抑制される時期が表皮層内、葉肉第一層内においても遅いことを示しているかのように見える。しかし、図 8C での *FILpro::GFP* 発現領域の面積データは葉原基の断面積あるいは長さ、つまり器官サイズをそろえて野生型と *enf2* を比較したのとは異なり、図 9B での *FILpro::CRE-GR* と *35Spro::loxP-Ter-loxP-VENUS* を用いた VENUS 発現領域の解析は播種後の日数をそろえて比較したものである。このことは、*enf2* の成長速度が野生型より遅かった場合、同じ播種後日数の植物で DEX 処理を行っても、*enf2* では野生型よりも器官サイズが小さい時点で DEX 処理したことを意味する。実際に野生型と *enf2* の成長速度は異なることを強く示唆するデータが得られており、1, 2 枚目本葉が約 500 μm 長に達するまでの播種後の時間が野生型では約 5.5 日、*enf2* では約 7 日、3 枚目本葉が約 1,000 μm に達するのが野生型では播種後約 8 日、*enf2* では約 10 日である。つまり、この VENUS 発現領域の面積のプロットからは、*FIL* の発現が中央から側方方向に次々抑制されてゆくのが *enf2* において遅いかどうか明確に結論付けることはできない。

以上の通り、中央から側方へ方向については *FIL* および *PHB* 発現動態を野生型と *enf2* で厳密に比較できない問題点は残ったが、*enf2* では少なくとも向

軸側から背軸側へ向けて葉原基の細胞が次々に *FIL* の発現を止めて *PHB* を発現するように次々変化するのが遅いことがわかった。

3-2-4. *enf2* 変異体における向背軸決定に関わる既知転写因子群の発現レベルの解析

FIL の発現パターンや組織全体での発現レベルは *AS2*, *ETT*, *PHB*, *REV*, *KAN1*, *KAN2* の機能欠損や全身的過剰発現によって影響を受けることが知られている (Siegfried et al., 1999; Eshed et al., 2001; Eshed et al., 2004; Fu et al., 2007; Huang et al., 2006; Iwakawa et al., 2007; Garcia et al., 2006)。このときの *FIL* の発現レベルの上昇や低下が、芽生えや茎頂組織全体の RNA を用いた定量的 RT-PCR で検出されている研究例が複数報告されている (Huang et al., 2006; Iwakawa et al., 2007; Garcia et al., 2006)。*enf2* 変異体において *FIL* と *PHB* の発現動態が野生型と異なることが、これらの向背軸決定に関わるとされる転写因子群 (*AS2*, *PHB*, *PHV*, *REV*, *FIL*, *YAB3*, *YAB5*, *KAN1*, *KAN2*, *KAN3*, *ETT*, *ARF4*) のどれかの発現レベルの変化に起因するのかどうか調べるため、その発現レベルを茎頂組織で解析した。用いたサンプルは 1, 2 枚目の本葉がおおよそ 500 μm に達した芽生えから子葉と胚軸以下を切除し、7 枚前後の葉原基を含む茎頂組織全体から全 RNA を抽出したもので、この RNA 中の mRNA 量を定量的 RT-PCR によって解析した (図 10)。結果 *AS2* と *ARF4* において、それぞれ野生型を 1 としたとき *enf2* では 1.24 倍と 1.55 倍と、わずかではあるが有為な発現上昇が観察された。しかし他の遺伝子の発現レベルは有意差が検出できなかった。さらに *AS2* は向軸側で発現して *FIL* の発現を抑制することから、この発現上昇が *enf2* における *FIL* の発現動態の異常を引き起こしているとは考えにくいものであった。これらのことから *ARF4* の発現上昇が *enf2* における *FIL* と *PHB* の発現動態の異常に関わっている可能性が示唆された。

しかし、一方で *ARF4* が 2 倍以上発現上昇する変異体や形質転換体でも *enf2* 以上の激しい形態的表現型を示さないこと (Garcia et al., 2006; Fahlgren et al., 2006) が知られている。このことから考えられる可能性として、他の転写因子も今回の PCR 法では検出できない程度にわずかつ発現変動をして、複合的な影響として *enf2* の表現型が現れていることや、今回調べた遺伝子の発現を変動させることなく *enf2* の表現型を引き起こす未知の機構がある可能性が考えられた。

3-3. *FIL* と *PHB* の発現動態に異常を示す *PHB* 様遺伝子の変異体の解析

前節 3-2 の解析から、変異体 *enf2* では *FIL* と *PHB* の発現領域の境界が背軸側へ移動するのが野生型よりも遅くなっていることが明らかとなった。そして、この遅れが原因となって、葉身が細くなり柵状組織の分化の異常が起きた可能性が示唆された。そこで、さらにこの因果関係を調べる目的で、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動と葉の形態や細胞分化の両方に異常を示す変異体の探索を行った。

3-3-1. 変異体 *phb-1d/+*での発生の進行に伴う *FIL* と *PHB* の発現動態

PHB 遺伝子の優性変異体 *phb-1d* は、*PHB* 遺伝子の mRNA 配列のうち miRNA165/166 によって認識される部分の配列に変異を持つため、miR165/166 によって分解されにくくなった変異体である(Mallory et al. 2004; 図 11A)。この変異は半優性変異であり、*phb-1d* ホモ変異体は棒状の葉を形成して、葉全体が向軸側様の細胞分化をするが、*phb-1d* ヘテロ変異体(*phb-1d/+*)は細い葉やラップ状の葉を形成することが知られている(McConnell and Barton 1998; 図 11B, C)。また、*phb-1d/+*の葉身の断面を観察すると柵状組織様の葉肉が比較的背軸側に近い部分まで広く形成される(Liu et al. 2011; 図 11D, E)。これらの *phb-1d/+*表現型は向軸側の性質が葉のより広い範囲に及んだものと考えられている。また *phb-1d/+*の葉原基では、*FIL* 発現領域が野生型よりも狭く見えるという報告がある(Siegfried et al., 1999)。

そこでまず、*phb-1d/+*でも葉の発生開始時点に *FIL* が葉原基予定細胞全てで発現しているのか、はじめから狭くなっているのか調べるため、*FILpro:CRE-GR* と *35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS* を導入して、播種時から恒常的に DEX 処理を行った。その結果、葉の全細胞、またはほとんどの細胞で VENUS の発現が見られ、葉の発生開始時には *phb-1d/+*でも野生型同様に全細胞で *FIL* が発現すると考えられた(図 11F, G)。また同時に、一定のサイズの葉原基で *FIL* の発現領域が野生型よりも狭く見えるなら、野生型よりも速い速度で *FIL* の発現が次々と抑制されて背軸側へ限定されてゆくのだらうと考えられた。

さらに、*phb-1d/+*で *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動の様子を調べるため、この変異体に *FIL* の発現マーカー *FILpro:GFP* と *PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro:miYFP-W* を導入して観察を行った。ただし注意すべき点として、こ

ここで *35Spro:miYFP-W* の発現パターンが示すのは miR165/166 耐性の *phb-1d* 変異を持つ *PHB* アリル(*PHB^{1d}*)でなく、miR165/166 によって発現抑制される野生型アリの *PHB* (*PHB^{WT}*)および他の *PHB* 様遺伝子 *PHV* と *REV* の発現パターンと考えられる。まず葉原基が 50 μ m 長前後の段階(P1-P2 期)においては、6 細胞層程度の厚みの部分のうち背軸側 3 から 4 細胞で *FILpro:GFP* が発現し、向軸側 2 から 3 細胞で *35Spro:miYFP-W* が発現しており、両発現の重複する細胞がわずかに見られた(図 11H, I)。さらに発生の進んだ 300 μ m 長前後の段階(およそ P6 期だが、葉原基ごとのサイズのばらつきがあるため、あまり正確でない)では、形態異常のため必ずしも野生型のような 6 細胞層の厚みを示すわけではないが、*FILpro:GFP* の発現領域は基部側でおよそ 2 細胞層、先端側で 0 から 1 細胞層になっていた(図 11J-L)。同時に、*35Spro:miYFP-W* の発現は残りの向軸側細胞層で見られ、*FILpro:GFP* と 1 細胞層程度で発現の重複が見られた(図 11J-L)。

以上の結果から、*phb-1d/+* においても野生型同様に *FIL* と *PHB^{WT}* の発現領域はわずかな重複を持って背軸側と向軸側に分かれており、葉の発生進行にともなって *FIL* の発現領域が相対的に縮小し、*PHB^{WT}* 発現領域が相対的に拡大してゆくことが明らかとなった。ただしその変化が野生型よりも速く進んでいる、つまりは *FIL* と *PHB^{WT}* の発現領域の境界が野生型よりも速い速度で背軸側へ移動し、最終的な位置も野生型よりも背軸側にまで移動している、と考えられた。

3-3-2. *PHB* 様遺伝子の劣性変異体における *FIL* の発現パターン

前節の *phb-1d* 変異は *PHB* の発現レベルが上昇する変異である。この変異体で *FIL* と *PHB^{WT}* の発現領域境界の移動が速まることから、*PHB* およびそれと冗長な機能の遺伝子とされる *PHV*, *REV* の発現レベルが低下すれば、この境界移動は遅くなるのではないかと予想された。この点を検証するためにマーカー遺伝子を持つ *PHB* 様遺伝子群の劣性変異体の解析を進めているが、現在までに *phb rev* 二重変異体について、*FILproGFP* の観察結果が得られているので、それを以下に記す。

まず、*phb rev* 二重変異体はトライコームの無い棒状の葉を形成し、これは葉全体が背軸側の性質を持つためと考えられている(図 12A)。この変異体において *FILpro:GFP* の発現パターンを調べたところ、棒状の葉の全細胞で

*FILpro:GFP*を発現していた(図 12B)。この変異体においては *35Spro:miYFP-W* の発現を未だ観察していないが、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が葉の発生開始時から全く起きていない可能性が示唆された。

3-4. 変異体 *enf2* の原因遺伝子と *enf2* のエンハンサー変異の同定と機能解析

以上の 3-2, 3-3 節の結果を総合すると、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が、野生型に比べて速い場合に向軸側の性質が広い範囲に与えられ、遅い場合に背軸側の性質が広い範囲に与えられた葉になるという相関関係を示している。そして、この境界移動の速さが実際に形態や細胞分化を決定する要因の一つであることを示唆する。また、この境界移動の速さは *PHB* の発現レベル制御そのものによって影響を受けることが *phb-1d/+* の観察結果から明らかとなった。

一方で *enf2* 変異体におけるこの境界移動の遅れがどのような機構で起きているのか、言い換えれば *enf2* の原因遺伝子 *ENF2* はこの境界移動の制御とどのように関与しているのか、という点はここまでの結果からは明らかでない。そこで以下では、*enf2* 表現型に関わる原因遺伝子の同定とその遺伝子機能に関する解析を行ったので、その結果を記す。

3-4-1. *enf2* のエンハンサー変異 *ene* の同定

enf2 変異体は葉原基における *FIL* と *PHB* の発現動態の異常だけでなく、成熟葉の葉が細く、緑色が薄い表現型を示すため、肉眼で容易に野生型から区別できる(図 13A, B)。しかし、*enf2* を野生型に戻し交配して F2 世代の植物を観察すると、親株の *enf2* と野生型との中間的な葉の形態と色をした弱い表現型の個体(図 13C)と、親株の *enf2* と同様の強い表現型の個体が得られることが知られていた。さらに、これらの表現型の分離比と遺伝様式から、強い *enf2* 表現型の原因となる遺伝子座は二つあると考えられていた(爲重 2009 修士論文)。このうち一方は単独変異でも弱い表現型を示すため *ENF2* と呼び、もう一方は単独変異体の表現型は野生型と区別できない(図 13D)が、*ENF2* の変異との二重変異体は強い表現型(特記しない限りこの表現型の個体を *enf2* と呼ぶ)を示すというものであり、*ENF2* *ENHANCER* (*ENE*)と呼ぶ(爲重 2009 修士論文)。*ENF2* は *AT1G31410* という遺伝子であると既に同定されており、変異体 *enf2* ではこの 2 番エキソン 3'側末端の塩基が G から A に塩基置換している (*enf2-1* アリルと呼ぶ; 爲重 2009 修士論文; 図 14A)。一方、*ENE* は染色体マッピングから 1

番染色体の下腕の末端付近に座乗していることが示唆されていたが、正確なマッピングの難しさから同定はされていなかった(爲重 2009 修士論文)。

そこでまず、*ENE*を同定するため、次世代シーケンサーを用いたゲノムリシーケンスによって *ENE*の候補となる変異の探索を試みた。ここで用いたサンプルは *enf2*を親株の野生型に戻し交配して得られた F2 世代の植物集団から *enf2*様の表現型を示す個体 (*enf2-1 ene* 両方の変異を持つであろう個体)を 16 個体集めてゲノム DNA を抽出したものである。そのため、この出力されるシーケンス情報の中でも *ENF2*と *ENE*の遺伝子近傍でのみ高頻度で、野生型配列は検出されず変異配列だけが検出されるはずである。実際、高頻度で変異配列だけが検出される領域は *ENF2*遺伝子近傍の他にもう一ヶ所、染色体 1 番の下腕末端付近に見られ、確かにこの領域に *ENE*が座乗していることが確認された(図 13E)。この領域の中でも、先の染色体マッピングから変異体の表現型と最も強く連鎖していた部分(TAIR10 (<http://www.arabidopsis.org/>) のゲノム情報での 1 番染色体 28,836,552 bp から 30,390,933 bp にかけて、およそ 1.5Mb の領域)において見つかった変異のうち、遺伝子のアミノ酸配列に変化をもたらすタイプの変異があったのは *AT1G78920*と *AT1G80070/SUS2*の二遺伝子だけであった。

そこで、まずこれらの遺伝子の T-DNA 挿入変異体を用いたアレリズムテストによってこれらの遺伝子が *ENE*であるのか判定を行った。ここでは一般的な単一劣性変異体ではなくエンハンサー変異のアレリズムテストであるので、*AT1G78920*の T-DNA 挿入変異株 (SAIL_165_F07, SALK_054291)と *AT1G80070/SUS2*の T-DNA 挿入変異株(*sus2-4*, *sus2-5*; 図 13F)を、それぞれ *enf2*と交配して『*enf2-1/+ ene/+*かつ *AT1G78920*または *AT1G80070*の T-DNA 挿入変異がヘテロ』という遺伝子型の F1 植物を作製し、F2 世代の表現型の分離比を計測した。もし、その T-DNA 挿入が *ENE*遺伝子座に起きているならば、F2 世代で弱い *enf2*表現型(*enf2-1* 単一変異体の表現型)は現れないことになる。一方 *ENE*とは別の遺伝子に T-DNA が挿入していれば、*ENF2*座と *ENE*座の遺伝距離から考えて弱い *enf2*表現型を示す個体が約 16%の頻度で現れると期待される。そしてこの弱い表現型の個体は、*AT1G78920*の T-DNA 挿入変異を持つ F2 からは 16%に近い頻度 (*enf2-1* 様個体/全 F2 個体 = 64/343 (SAIL_165_F07), = 43/252 (SALK_054291))で出現し、*AT1G80070/SUS2*の T-DNA 挿入変異を持つ F2 からはほとんど出現しなかった(*enf2-1* 様個体/全 F2

個体 = 3/528 (*sus2-4*), = 0/403(*sus2-5*)). この分離比から *AT1G80070/SUS2* が *ENE* であると強く示唆された。

そこで、*AT1G80070/SUS2* の変異が *enf2* 表現型を昂進していることを示すために、野生型配列の *AT1G80070/SUS2* を含むゲノム断片を変異体 *enf2* に導入することで *ENE* の機能相補実験を行った。変異体 *enf2* に *AT1G80070/SUS2* を導入したところ、期待通り葉の細さと色は *enf2-1* 単一変異体らしい弱い表現型を示すようになった(図 13G-J)。さらに、*FILpro:GFP* 発現領域のサイズを測定すると、*enf2* よりも *FILpro:GFP* の発現領域が狭くなった(図 13K)。以上の結果を総合して *AT1G80070/SUS2* は *ENE* であると結論付けられた。

AT1G80070/SUS2 にコードされるタンパク質は、出芽酵母のスプライセオソームのサブユニット Prp8 のホモログであり、mRNA のスプライシングに広く関わる重要な因子だと考えられている(Grainger and Beggs, 2005)。さらに、シロイヌナズナの *AT1G80070/SUS2* のノックアウト変異体(*sus2* 変異体と呼ばれる)は胚性致死であることが知られており(Schwartz et al., 1994)、実際に上記の *sus2-4*, *sus2-5* のヘテロ変異体の自殖種子はおおよそ 1/4 が発芽しなかった(発芽しなかった種子/全 F2 種子 = 110/528 (*sus2-4*), = 94/403(*sus2-5*)). 一方で変異体 *enf2* が持っていた *ene* 変異はアミノ酸置換型の変異(G708R, 図 13F)であり、この単独変異体は見た目の表現型も *FILpro:GFP* の発現パターンも野生型と区別できなかった(図 13G)。つまり、*ene* 変異は *enf2-1* 変異依存的に *FIL* と *PHB* の発現動態と葉の形態形成に関与すると言える。

一方、*enf2-1* 変異は、野生型の ORF 上で考えるとアミノ酸配列に変化を起こさない塩基置換だが、エキソン末端の変異であるため *ENF2* の mRNA スプライシングが正常に起こらず、*ENF2* の遺伝子機能が低下した状態にあると考えられていた(爲重 2009 修士論文; 図 14A)。しかし、*ENF2* 遺伝子の null 変異体と考えられる T-DNA 挿入変異体 (*enf2-2*) は *enf2* よりもさらに強い表現型を示し、アルビノで、極めて細い葉を数枚形成するが、芽生え致死であった(図 14B)。このことから *enf2-1* 変異によってスプライシングが正常に起こりにくい状況でも、少量の機能的な *ENF2* mRNA が合成されていることが示唆されていた。

以上の三点、1. *ENE* がスプライシングに関わる因子である。2. *ene* 変異は *enf2-1* 変異に依存して葉の発生に影響する。3. *enf2-1* 変異は *ENF2* 遺伝子のスプライシング異常によって *ENF2* 機能を低下させる。という事実から、*ene* が

enf2-1 変異の表現型を昂進する機構について一つの可能性が考えられた。それは *ene* 変異によって *enf2-1* 変異体での *ENF2* mRNA のスプライシング異常が昂進し、*ENF2* の機能的な mRNA 量がさらに低下する、という可能性である。これを検証するには *ENF2* の機能的な mRNA 量を定量する必要があるが、一般的な RT-PCR とアガロースゲル電気泳動による *ENF2* mRNA の解析では、十分な感度と特異性でこの定量ができない。というのも、2 番と 4 番のエキソン内にアニーリングするプライマーを用いた場合、*enf2-1* 変異体からは野生型サイズの mRNA 由来の PCR 断片を、エチジウムブロマイドの蛍光によって明確に検出できなかったからである(図 14C)。一方、正常なエキソン境界部をまたいでアニーリングするプライマーによって野生型サイズの mRNA を特異的に増幅した場合には、野生型よりも少量の PCR 断片が *enf2-1* のサンプルから検出された(爲重 2009 修士論文)が、本当に野生型サイズの mRNA を鋳型として PCR の増幅が起きたのか、異常なスプライシングによって機能的でない配列だが偶然プライマーがアニーリングし易い配列の mRNA が生じて鋳型となったのか、確認できないという問題があった。

そこで、2 番と 4 番のエキソン内にアニーリングするプライマーで RT-PCR した後、高感度かつサイズ分解能の高いマイクロ流動型電気泳動システムによって野生型サイズの mRNA の検出を試みた。その結果、野生型と同じサイズの PCR 断片が *enf2-1* および *enf2-1 ene* 由来の試料から検出され、かつその電気泳動図におけるピークの大きさが *enf2-1* 由来のものより *enf2-1 ene* 由来のものの方が小さくなっていた(図 14D)。さらに、この野生型様サイズの PCR 断片をアガロースゲル電気泳動のゲル片から抽出して再度 PCR 増幅し、塩基配列を確認したところ、*enf2-1* のサンプルからも *enf2-1 ene* のサンプルからも野生型と同じスプライシングパターンの塩基配列が読み取れたので、泳動図で同じ位置に見られる野生型様サイズのピークは確かに野生型と同じ機能的 *ENF2* mRNA の量を示していると考えられた。

以上の結果は、*ene* 変異は *enf2-1* 変異によるスプライシング異常を昂進することで *ENF2* 機能を低下させ、*FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態形成に間接的に関わることを示唆していた。これは *ENE* つまり *AT1G80070/SUS2* の遺伝子機能についての重要な示唆ではあるが、本研究の目的上より重要な *ENF2* 機能と向背軸に沿った遺伝子発現制御の関わりを探る上では、*AT1G80070/SUS2* はあまり重要な意味を持たないと考えられる。そこで、以下では *ENF2* の遺伝

子機能に注目して解析を行った。

3-4-2. *ENF2* 遺伝子の葉緑体の発達に関わる機能

ENF2 遺伝子はプラスチド局在タンパク質をコードしていることが、GFP の融合によるイメージングによって明らかとなっており(爲重 2009 修士論文)、また近年のプロテオーム解析においても *ENF2* タンパク質、およびトウモロコシの *ENF2* ホモログがプラスチド画分から検出されていた。*ENF2* タンパク質の分子機能は不明だが、すでに述べた通り変異体 *enf2* は葉の緑色が野生型よりも薄く、葉原基や若い葉のクロロフィル蛍光も弱いことがわかっていた(爲重 2009 修士論文; 図 8I, J)。さらに *ENF2* の null 変異体と考えられる *enf2-2* はアルビノの表現型を示した。これら *ENF2* 遺伝子の変異体を示す表現型は、*ENF2* 機能が葉緑体分化になんらかの形で関わっていることを示していた(図 14B)。

そこでこの葉緑体分化と *ENF2* の関わりについて詳しく知るため、*enf2* 変異体における葉緑体分化の様子を透過型電子顕微鏡観察によって解析した。まず野生型の茎頂分裂組織のプラスチドは、原色素体と呼ばれ、小さくて内膜系の発達がほとんど見られない単純な構造をしている(図 15A)。この単純な構造は *enf2* の茎頂分裂組織のプラスチドにおいても見られ、特に野生型との顕著な違いは見られなかった(図 15D)。次に葉原基(厳密ではないが P3-P6 程度の段階)においては、野生型でプラスチドのサイズが茎頂分裂組織のものより肥大し、数層の重なったチラコイド膜と、ちいさなデンプン粒も見られた(図 15B)。これらの構造はいわゆる葉緑体らしい構造を発達させている途中の構造だと考えられる。一方 *enf2* では同様の発生段階の葉原基のプラスチドは野生型のものよりも小さく、チラコイド膜もあまり発達しておらず、茎頂分裂組織のプラスチドと似ていた(図 15E)。さらに発生の進んだ成熟葉のプラスチドは、*enf2* でも野生型と同様にいわゆる葉緑体らしい構造をしており、5-10 μm 程度の直径を持ち、チラコイド膜は何層にも重なっており、大きなデンプン粒も見られた(爲重 2009 修士論文; 図 15C, F)。以上の結果から、*enf2* では最終的にほとんど正常な構造の葉緑体を形成できるが、その発達過程が野生型よりも遅れていると考えられた。

一方アルビノの *enf2-2* 変異体においては、茎頂分裂組織でも葉原基でも原色素体様の構造のプラスチドが見られた(図 15G, H)が、成長した葉では葉緑体様

の構造は見られず、二重膜オルガネラでミトコンドリアとは異なる異常な膜構造のオルガネラが見られたので、これがプラスチドだと考えられた(図 15D)。つまり *enf2-2* では葉の発生過程で、葉緑体構造を発達させることが全くできていないと考えられた。

これらの電子顕微鏡観察から、ENF2 タンパク質の機能は、葉の発生過程でプラスチドが原色素体から葉緑体へと分化する上で必要であることが示された。ENF2 タンパク質は特にこのプラスチド分化の開始、あるいはかなり初期の過程を進めるために重要な機能を持つことが示唆された。

3-5. 葉緑体の発達阻害による *enf2* 表現型の再現

前節で *enf2* では葉緑体発達の過程が正常に進んでいないことを示した。しかし、これが原因となって *enf2* における *FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態形成の異常を引き起こしているかどうかは不明であった。そこで、この因果関係を検証するため、野生型植物において葉緑体の発達を阻害した場合に *enf2* 様の表現型が見られるかどうかを調べた。シロイヌナズナの葉緑体発達を阻害する生育条件として、ここでは多くの先行研究で利用され、葉緑体への作用機序がある程度理解されている次の四つの条件を試みた。リンコマイシン処理、エリスロマイシン処理、ノルフラゾン処理、および暗所での生育である。

リンコマイシンおよびエリスロマイシンは原核型リボソームの阻害剤で、植物においては原核型リボソームを持つプラスチドでのタンパク質合成を阻害するが、細胞質やミトコンドリアのタンパク質合成には明確な阻害効果を示さないことで知られている(Mulo et al., 2003)。まずこれらの阻害剤を 100 μ M 以上の濃度で含む培地で野生型を生育させたところ、一貫して芽生え全体が白くなり、葉の形態は比較的正常に見えるものとやや細く鋸歯の発達したものが見られた(図 16A, D)。さらに、濃度を 200 μ M 以上にすると一貫して細い葉が形成され、中には針状の葉も見られた(図 16B, E)。このとき葉原基における *FIL* の発現マーカー *FILpro::GFP* と *PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro::miYFP-W* の発現パターンを観察すると、*FILpro::GFP* の発現領域が維管束前駆細胞を取り囲むように広く発現し、*35Spro::miYFP-W* はこの維管束前駆細胞と残りの狭い向軸側領域でのみ発現していた(図 16C, F)。この特徴的な発現パターンは標準的な生育条件の野生型では全く見られない(図 16N)が、*enf2* ではよく見られるパターンであり(図 8B)、*enf2* 同様に *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が遅延

していることが強く示唆された。

次にノルフラゾン(1-methyl-3-(3,4-dichlorophenyl)-5-pyrazolone)はファイトエン不飽和化酵素の阻害剤であり、結果この酵素反応を必要とするカロテノイドの生合成を阻害する(Breitenbach et al., 2001)。ノルフラゾン処理した植物は白化するが、これは光合成反応に利用できない過剰な光エネルギーを散逸するためのカロテノイドが不足し、そのエネルギーによってプラスチド内部で光毒性を過剰に生じるためと考えられている(Oelmüller, 1989)。野生型植物を白化させるのに必要なノルフラゾン濃度は250 nMであった(図 16G)が、その100倍高い濃度(25 µM)のノルフラゾンを含む培地で育てても、野生型植物は丸い形態の葉を形成し、リンコマイシン処理やエリスロマイシン処理の場合のような細い、または針状の葉は形成されなかった(図 16H)。このとき葉原基における *FILpro::GFP* と *35Spro::miYFP-W* の発現パターンは標準的生育条件での野生型と似ており、*enf2* やリンコマイシン処理、エリスロマイシン処理の場合のように *FILpro::GFP* 発現領域が明確に広いまたは *35Spro::miYFP-W* 発現領域が明確に狭いというパターンは見られなかった(図 16I)。

また、暗所で育てた植物は、光受容体のシグナルで制御される葉緑体形成に関わる遺伝子発現が起らず、緑色の葉緑体を持たない黄化芽生えとなる。このとき葉は一見細長い形態に見えるが、これは葉柄の伸長によるもので(図 16J)、葉身は丸い形態で形成されていた(図 16K)。この条件での葉原基においても *FILpro::GFP* と *35Spro::miYFP-W* の発現パターンは標準的生育条件の野生型と似ており、*FILpro::GFP* 発現領域が明確に広いまたは *35Spro::miYFP-W* 発現領域が明確に狭いといったパターンは見られなかった(図 16L)。

以上の葉緑体形成の阻害実験の結果、*FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態形成はプラスチドのタンパク質合成が阻害されると *enf2* 様の表現型となることがあるが、緑色の葉緑体を形成することそのものが阻害されても、必ずしも *enf2* 様の表現型とならないことが示された。

3-6. プラスチド遺伝子発現に関わる変異体 *flavodentata (flv)* の表現型

リンコマイシン処理およびエリスロマイシン処理下で生育した野生型植物は、*FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態という点で *enf2* とよく似た表現型を示す一方、色が白く、花茎が伸長せずに成長が停止した点では、緑色で稔性のある *enf2* と異なっていた。このことから、リンコマイシン処理、エリスロマイシン処理

の植物は *enf2* よりも広範なプラスチド機能の異常あるいはそれ以外の細胞機能の異常を生じていることが示唆された。このような葉緑体形成不全や成長停止も一因として *FIL* と *PHB* の発現や葉の形態の異常につながった可能性は否定できない。もし、プラスチド遺伝子発現の阻害を直接的な作用点とするような別の生育条件や遺伝子変異によって、*enf2* 様の *FIL* と *PHB* の発現異常や葉の形態を示すが、緑色で稔性があるという植物が存在すれば、葉緑体形成や成長停止に依存せずに、プラスチド遺伝子発現活性の変化が主要な原因として *FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態の変化を起こすことを強く支持するはずである。

そこで、プラスチド遺伝子発現への関与がある程度明らかにされている既知の変異体で、そのような表現型を示しそうなものを探した。そして、*flavodentata* (*flv*) という変異体がそれに相応しいものと考えられた。この変異体の原因遺伝子 *FLV* は核コードの遺伝子であるが、この遺伝子産物 *FLV* タンパク質はプラスチド内で mRNA の RNA 編集に関与する PPR タンパク質である。そして *FLV* は、プラスチドの RNA ポリメラーゼサブユニットをコードする *rpoC1* の mRNA の RNA 編集に必要であることがわかっていた (Bersoult et al., 2009; Ian Small 教授, 私信)。一方で *flv* は葉の形態が細く鋸歯が発達することが報告されていた (Serrano-Cartagena et al., 1999)。実際に当研究室において *enf2* と同じ生育条件で育てて観察したところ、*flv* の葉の形態は細く鋸歯が目立つ点で *enf2* と似ており、葉の緑色も *enf2* より濃い野生型よりも薄い点で *enf2* と似ていた (図 17A, C)。さらに、*flv* に *FIL* の発現マーカー *FILpro::GFP* と *PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro::miYFP-W* を導入して観察結果した結果、*enf2* やリンコマイシン処理、エリスロマイシン処理の植物とよく似た広い *FILpro::GFP* 発現領域と狭い *35Spro::miYFP-W* 発現領域が見られた (図 17B, D)。

この *flv* の表現型と前節のリンコマイシン処理、エリスロマイシン処理の結果から、プラスチド遺伝子の転写、翻訳に関わる機能が低下すると、それが原因となって *enf2* のように *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動の遅延と細い葉の形成が引き起こされるという因果関係が強く示唆された。プラスチドゲノムは光合成やその他の代謝に関わる遺伝子をコードしているので、プラスチド遺伝子の転写、翻訳機能は、プラスチド内の RNA 量やタンパク質量だけでなく、光合成活性など様々なプラスチド機能側面と関係しているはずではある。ただし、この *FIL* と *PHB* の発現動態への影響は、光合成活性が無くなったり、成長が停止したりすることの結果として二次的に起こるのでなく、そうした生育阻害

とはある程度独立に、プラスチド遺伝子発現状態に応じて起こることが強く示唆された。

3-7. *enf2* におけるプラスチド遺伝子の発現低下

前節までの結果から、*enf2* においてもプラスチド遺伝子の転写および翻訳レベルが低下しているために、*FIL* と *PHB* の発現動態と葉の形態に異常が生じたという一つの可能性が考えられた。

この可能性を検証するためプラスチドゲノムの中でタンパク質をコードする全 80 遺伝子とリボソーム RNA をコードする 2 遺伝子について、発現レベルを定量的 RT-PCR によって網羅的に調べた。ここで用いたサンプルは 3-2-4 節と同様に茎頂分裂組織と 7 枚前後の葉原基の全 RNA を抽出したものである。結果として、発現レベルは野生型での値に対して *enf2* では 104.9% から 26.6% まで様々な値をであったが、概ね発現レベルは低下しており、平均で野生型比 52.9% であった(図 18A)。これらは mRNA の存在量を定量したものであるため、基本的には転写レベルまたは RNA の安定性が野生型より低下していることを示しているが、リボソーム RNA の量も低下している(図 18A 右端 2 つのデータ点)ことから、タンパク質合成活性も低下していることが示唆された。この結果から、ENF2 タンパク質は野生型においてはプラスチド遺伝子の発現レベルを全体的に高くする上で必要な機能を、直接的か間接的かは不明だが、果たしているものと考えられた。

一方、*enf2* 変異体における形態異常がこのプラスチドの RNA レベルの低下によるのであれば、リボソーム RNA に結合してその活性を阻害するリンコマイシンの効果と *enf2* 変異の効果は相加的な影響を持つと期待される。実際 *enf2* を 150 μ M という中程度の濃度のリンコマイシンで処理すると、84%(93 個体中 78 個体)の個体で 1,2 枚目の本葉が針状の葉となった(図 18B)。野生型では 150 μ M のリンコマイシン処理では細い葉になるものが多く、丸い形態の葉も数パーセントの個体で見られ、針状の葉は 10%程度(96 個体中 9 個体)でだけ見られたが、450 μ M のリンコマイシン処理条件では針状の葉(12 個体中 12 個体)ばかりが見られた(図 18C)。これらの結果は、強い証拠とまでは言えないが、プラスチド遺伝子の発現活性が *enf2* 変異による低下とリンコマイシン処理による低下の相加的な影響によって、より強い形態的影響が出たものと解釈することができる。

3-8. ノルフラゾン処理による影響とプラスチドの直接的な翻訳阻害の影響との違い

前節までの結果からは、プラスチド遺伝子発現レベルが低下すると、変異体 *enf2* のように *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が遅延し、葉が細くなることが示唆された。しかし、こうした *enf2* 様の表現型が見られないノルフラゾン処理された植物においても、プラスチド遺伝子のいくつかが発現低下することが知られている(Ankele et al., 2007; Woodson et al., 2013)。こうした既知の知見は芽生え全体から RNA を抽出して調べた結果のものだが、このことからプラスチド遺伝子のいくつかの発現レベルが低下しても *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動や葉の形態にあまり影響しないことが示唆される。

そこで次に、茎頂組織においてもノルフラゾン処理によってプラスチド遺伝子発現レベルが低下するかどうかを調べるため、前節と同様の茎頂組織を用いて qRT-PCR によって RNA レベルを調べた。現在までにプラスチドの RNA ポリメラーゼサブユニットをコードする 4 遺伝子(*rpoA*, *rpoB*, *rpoC1*, *rpoC2*)、rRNA の 2 遺伝子(*rrn16S*, *rrn23S*)、光合成に関わる 5 遺伝子(*rbsL*, *psaA*, *psaB*, *psbA*, *psbE*)、その他の 2 遺伝子(*accD*, *clpP*)について mRNA と rRNA の定量を行ったが、いずれも *enf2* と同程度かそれ以下にまで RNA レベルが低下していた(図 19A)。プラスチドゲノムの全遺伝子を調べたわけではないが、この結果から、茎頂組織全体でのプラスチド遺伝子のいくつかの発現レベルが低下しても必ずしも *enf2* 様の表現型は現れないものと考えられた。

葉の形態はノルフラゾン処理では *enf2* 様にならないがリンコマイシン処理では *enf2* 様になるということから、一つの可能性として、ノルフラゾン処理のように光傷害による間接的影響ではなく直接的にプラスチドのリボソーム活性が阻害されることで *enf2* 様の細い葉が形成されることが考えられた。そこで、ノルフラゾン処理とリンコマイシン処理を同時に行うことでこの可能性を検証した。その結果、この同時薬剤処理された野生型植物は、ノルフラゾン処理のみの場合と異なり細い葉を形成した(図 19B)。このことから、直接的にプラスチドのリボソーム活性が阻害されることで *enf2* 様の葉の形態形成が起こるが、いくつかのプラスチド遺伝子の発現レベルが茎頂組織で低下することそのものが必ずしも原因ではないと考えられた。

3-9. *GUN1* 遺伝子の変異によるプラスチド遺伝子発現阻害効果の抑圧

前節までの結果からは、プラスチドゲノムの遺伝子発現というオルガネラにおける現象が、核の遺伝子である *FIL* と *PHB* あるいは miRNA165/166 の発現制御や葉の形態制御に、どのようにして関わるのかという問題にはほとんど答えることができない。一方、核ゲノムの遺伝子がオルガネラの状態に応じて発現制御される、という現象自体は以前から知られている。特にプラスチドでのテトラピロール生合成系の代謝状態や遺伝子発現状態が変動すると、*GUN1* という核遺伝子の機能に依存して光合成関連の核遺伝子の発現レベルが変化することが知られている(Woodson and Chory, 2008; Pogson et al., 2008; Larkin and Ruckle, 2008; Pfannschmidt, 2010; Inaba et al., 2011)。またテトラピロール生合成系の代謝状態に応じて核の光合成関連遺伝子が発現変化する場合には、*GUN1* だけでなく *GUN2*, *GUN3*, *GUN4*, *GUN5* (*GUN2-5*)という遺伝子群が関わっているが、プラスチド遺伝子発現に応答した核の光合成関連遺伝子の制御には *GUN2-5* が関与しないことが知られている(Koussevitzky et al., 2007; Cottage et al., 2008)。

そこで、プラスチドの遺伝子発現に応答した *FIL* と *PHB* の発現動態変化と葉の形態変化にも *GUN* 遺伝子が関与しているのか調べるため、これらの遺伝子の変異体のうち *gun1*, *gun5* にリンコマイシン処理してその応答を観察した。その結果、*gun5* は野生型と同様に細い葉を形成した(図 20A)が、*gun1* は丸く展開した葉を形成した(図 20B)。さらに、*gun1* に *FIL* の発現マーカー *FILpro::GFP* と *PHB* 様遺伝子の発現のマーカー *35Spro::miYFP-W* を導入して葉原基における発現パターンを観察したところ、野生型にリンコマイシン処理した場合と異なり、*FILpro::GFP* の発現領域が明らかに大きい、あるいは *35Spro::miYFP-W* の発現領域が明らかに小さいといったパターンは見られなかった(図 20C)。ただしこの結果だけでは、*gun1* が *FIL* と *PHB* の発現動態変化に関してリンコマイシン処理に非感受性なのか、本来野生型よりも *FIL* 発現領域が小さく、*PHB* の発現領域が大きい変異体であるためにリンコマイシン処理の結果を相殺したのか明確でない。そこで、リンコマイシンを含まない培地上で生育した場合の *gun1* の表現型も観察した。*gun1* は外見上野生型と区別できないと報告されており(Mochizuki et al., 2001)、実際に *gun1* の葉の形態には本研究で用いている野生型と同じ培地で育てても目視や実体顕微鏡で区別できるような差異を見られなかった(図 20D)。また、このとき *gun1* における *FILpro::GFP* と *35Spro::miYFP-W* の発現パターンを観察しても、やはり野生型と同様のパター

ンで背軸側と向軸側に分かれて発現していた(図 20E)。ここで、発生段階ごとに分けて *FILpro:GFP* の発現領域サイズを測定しても、発生開始後間もない葉原基(横断面積 5,000 μm^2 以下、およそ P2 から P4 期程度に相当)、側方への成長をしている葉原基(断面積 5,000 ~ 10,000 μm^2 、およそ P4-P6 期に相当)、発生がある程度進行して葉らしい平面的な形態をしている葉原基(断面積 10,000 ~ 15,000 μm^2 、およそ P6-P8 期に相当)、のいずれでも野生型との有意差を検出できなかった(図 20F)。つまり、*FIL* と *PHB* の発現動態変化に関して *gun1* はリンコマイシン処理に対して非感受性であることが示された。これらの *gun1* の表現型から、プラスチド遺伝子発現が阻害されている状況において、*GUN1* は *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動を遅れさせ、葉を細くするのに必要な機能を果たすと言える。一方野生型で、葉緑体分化が正常なときには *GUN1* はこれらの葉の形態に関わる機能を果たしていないと考えられた。

enf2 変異体で見られる *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動の遅延と葉の細い形態がプラスチド遺伝子発現系の機能異常に依るのなら、*gun1* 変異によってこれらの表現型も抑圧されると期待される。実際に *enf2 gun1* 多重変異体(遺伝子型としては *enf2-1 ene gun1-1* 三重ホモ接合体)を作製したところ、予想通り丸い形態の葉を形成した(図 20H)。さらにこの変異体における *FILpro:GFP* と *35Spro:miYFP-W* の発現パターンも、予想通り *enf2* よりも野生型のものと似ていた(図 20I)。一方、*enf2 gun5* 多重変異体(*enf2-1 ene gun5-1*)は *enf2* 様の葉の形態のままであり(図 20G)、この結果からも *enf2* 変異がリンコマイシン処理時と同様の機構を介して葉の形態形成に影響していることが支持された。

しかし一方で、*enf2 gun1* は全ての特徴が *enf2* より野生型に似ていたわけではなく、葉の緑色は *enf2* よりもさらに薄く、ほとんどアルビノであり、成長も遅く、芽生え致死性であった(図 20H)。このアルビノの表現型から、*gun1* による *enf2* の *FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態異常の抑圧は、プラスチドの状態が野生型レベルにまで回復したためという解釈よりも、プラスチドの異常があるにも関わらず *GUN1* が機能しないため *FIL* と *PHB* の発現動態や葉の形態があまり影響を受けなくなったためという解釈が妥当なものと考えられる。同時にこのアルビノの表現型は、*GUN1* 遺伝子のある機能側面を示唆している。それは、プラスチド遺伝子の発現システムにある程度の異常が生じて、光合成能のある葉緑体を形成し、生育を持続させるような適応性を植物が本来持っており、*GUN1* がその適応性を発揮するのに必要であるということである。

この点がリンコマイシン処理の実験によっても支持されるか調べるため、野生型と *gun1* を 150 μ M リンコマイシン培地で 2 週間生育させて、ほとんど成長が止まった個体を標準の培地に移してその成長を観察した。このとき野生型は成長を再開して、緑色の葉を形成し、花茎が伸長して開花した(図 20J)のに対し、*gun1* は成長を停止したままであった(図 20K)。また、*flv* 変異体は淡緑色の葉色と細く尖った葉の形態を示す(図 17A)が、*flv gun1* 二重変異体は葉の形態が野生型のように丸い一方で、部分的に白化した斑入りの葉となった(図 20L)。さらに、*flv gun1* 二重変異体は長期間生育すれば開花、結実したが、種子の収量は *flv* 単独変異体よりも遥かに少量であった。これらの結果からも、プラスチド遺伝子発現システムが阻害されると成長や緑化が阻害されるが、このような厳しい環境に対して植物は、*GUN1* 機能に依存してある程度抵抗し、光合成能力を保ち、持続的に成長する能力があると考えられた。

第四章 考察

4-1. 葉の発生における *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動の重要性

本研究から明らかとなった *FIL* と *PHB* の発現動態は、向軸側と背軸側の遺伝子発現領域の形成と維持についての従来の考えと一致せず、葉の発生過程を理解する上で重要な発見と考えられる。以下 4-1 節ではこの *FIL* と *PHB* の発現動態から考えられる葉の発生機構モデルと過去の知見との比較、他に考慮すべき点や今後の課題などを述べる。

4-1-1. 向軸側細胞と背軸側細胞の決定過程に関する従来の説と *FIL*, *PHB* の発現動態の比較

葉の向軸側と背軸側の領域決定と横方向平面的な葉身の形成の過程についての従来からの考え方は、主に過去に行われた一連の顕微手術の研究例から確立されて来た。それは新たに発生を開始する葉原基と茎頂分裂組織の間に刃物などで切れ込みを入れて、両者を物理的に分離するという顕微手術である。その結果、発生開始頃(実験条件によるが、およそ P0 から P1 期頃)に切れ込みを入れるとその原基は全体が背軸側化した針状の葉へと成長し、発生を開始して後の段階で切れ込みを入れるとその原基は正常な向軸側と背軸側をもつ扁平な葉へと成長する(Sussex, 1954; Snow and Snow, 1959; Hanawa, 1961; Reinhardt et al., 2005)。また、この分裂組織と葉原基を初期に分離するのは、最も表面の細胞層(L1 層)でのみ分離しても背軸側化した針状の葉が形成される(Reinhardt et al., 2005)。

こうした実験結果と、他の遺伝学的研究結果などから次の様なモデルが考えられて来た。まず茎頂分裂組織の側方領域で葉原基が発生を始める前後に、茎頂分裂組織の中央付近から葉原基の近接する細胞群(つまり向軸側の細胞群)へ、L1 層を経由してなんらかのシグナルが伝わり、この細胞群が向軸側の性質を持つようになる。このシグナルが伝わらないと、葉原基の細胞は最終的に葉の背軸側の性質を持つため、背軸側の細胞群はその性質を持つようになる。こうして向軸側と背軸側の性質を持つ細胞群が適切な分布で分かれる。この後は茎頂分裂組織からのシグナルが無くとも両細胞群の性質が維持されながら器官が成長して、向軸側と背軸側それぞれの性質に従って非対称な組織分化が起こる。また、この向軸側と背軸側の性質を持つ細胞群が隣接していることに依存して、

両者が隣接した状態を保つような細胞分裂が活性化する。このため、側方への器官成長が起これ最終的に平面的な葉身が形成されると言われてきた(Waites and Hudson, 1995)。

この向軸側と背軸側の性質を持つ細胞群というのは、明確に定義されていたわけではないので、当初は概念的な存在であった。しかし遺伝学的な研究が進むに連れて、これらは特定の遺伝子を発現する細胞群として位置付けられるようになった。例えば *PHB*, *PHV*, *REV*, *AS2*, *tasiR-ARFs* などを発現するのが向軸側の性質を持つ細胞群、*FIL*, *YAB3*, *YAB5*, *KAN1*, *KAN2*, *KAN3*, *ETT*, *ARF4*, *miR165/166* などを発現するのが背軸側の性質を持つ細胞群というように、研究者によって細かい見解の違いはあるが、細胞群の性質を定義するものとして遺伝子が記述されてきた(Kidner and Timmermans, 2010; Efroni et al., 2010; Szakonyi et al., 2010; Yamaguchi et al., 2012; Byrne, 2012)。その理由の一つは、実際にこれらの遺伝子を機能欠損させたり全身的に発現させたりすることで、向軸側化あるいは背軸側化した葉が形成されることが知られていることである(序章 1-3 節参照)。もう一つは、これらの遺伝子が向軸側と背軸側に分かれて発現しているように見えること、しかもその発現パターンが P1 期またはもう少し後の時期から、平面的で非対称な葉らしい形態が完成する時期まで、しばらく続くことである。

一方で本研究での詳細な解析から、葉の全細胞で *FIL* の発現と *miR165/166* 活性が現れた後、向軸側中央の細胞から側方および背軸側の細胞へ向かって次々にこれらが抑制され、同時に *PHB* を発現するように切り替わってゆくことがわかった。これは次の二点で従来の見方と異なるように思われる。一点目は、葉の発生開始頃に向軸側と背軸側それぞれの性質を持つ発現細胞群が確立して、後に維持されるという顕微手術から提唱されてきた考え方と本研究結果とのずれであり、二点目は、向軸側と背軸側の遺伝子発現領域が実際に維持されているように見えるという過去の観察事実と本研究結果との違いである。しかし、どちらも本研究で見られた *FIL*, *PHB* の発現動態と矛盾してはいない。

まず、一点目の問題は向軸側と背軸側の性質を持つ細胞群が茎頂分裂組織からシグナルによって確立されるという考え方が、顕微手術の結果からは議論でない点に踏み込んだ考えを含んでいることにある。顕微手術の結果から言えるのは、切れ込みを入れると葉の向軸側の性質が見られなくなるという結果から、茎頂分裂組織からのシグナルと呼ぶべき何らかの効果があるということである。

しかし、そのシグナルが伝わった時点で葉原基の将来向軸側と背軸側の領域を形成する細胞系譜が選ばれ運命決定されると考えるべきなのか、単に向軸側と背軸側の運命決定に必要な情報源が与えられたに過ぎず、運命決定は後の発生過程で起こると考えるべきなのか、については顕微手術の結果からどちらか一方を支持する議論ができない。そして、前者を否定する証拠は無いのだが、少なくとも *FIL* と *PHB* の発現動態は後者とよい整合性を示す。つまり茎頂分裂組織と接している L1 層の細胞（葉原基の向軸側中央の細胞）で *FIL* の発現と miR165/166 の活性が抑えられて *PHB* を発現するようになるが、これらの細胞だけがそのまま将来の向軸側領域全体の細胞系譜をなすのではなく、あくまで向軸側を規定する情報源として後の過程で向軸側領域になるべき細胞を *FIL* 発現状態から *PHB* 発現状態へと次々転換させてゆくと考えられるということである。このシナリオに沿って考えると、切れ込みのためにシグナルが伝達されず向軸側中央の細胞が *PHB* 発現細胞に切り替わらなかったなら、葉原基の全細胞が *FIL* を発現し、miR165/166 活性を維持したままになると予想されるが、実際に切れ込みによって背軸側化した葉が形成されるという過去の結果と一致する。

次に、*FIL* と *PHB* の発現動態が従来の見方と異なる二点目は、過去の観察結果として *FIL* と *PHB* を含めて背軸側と向軸側の遺伝子発現領域が維持されているように見えるというものである。まずこれについて注意すべきは、*FIL* と *PHB* 以外の遺伝子、たとえば *KAN* 遺伝子群や *AS2* などの遺伝子の発現領域については本研究で詳細な解析を行っていないので、これらは葉の発生過程を通じて細胞系譜の中で維持されている可能性があるという点である。この点に関わる知見として、向軸側での *AS2* と *PHB* の発現領域は少し異なり、背軸側での *KAN1* と *FIL* の発現領域は少し異なるという報告がある(Nakata et al., 2012; La Rota et al., 2011)ので、ここでは *FIL* と *PHB* 様遺伝子に集中して議論すべきである。そして、序章で述べた通り *FIL* の発現領域が変化するという点は先行研究において記述された例はある(Sawa et al., 1999; Siegfried et al., 1999; Nakata et al., 2012)。しかし本研究ほど幅広い発生段階に渡って詳細に観察していないために、継続的な領域サイズの変化に気付かなかった、または気付いても注目されなかったものと考えられる。また、過去の観察例の多くが主に茎頂分裂組織の頂上付近での横断面を観察したものであるという点も *FIL* と *PHB* の発現領域が維持されているように見えた原因であろう。本研究におい

でもそのような位置の観察面では、*FIL* と *PHB* の発現領域サイズが発生段階に伴って変化していると一見して判断できるほどには違わず、面積測定と統計処理によって *FIL* 発現領域の比率が減少していると結論づけられるものであった(図 3A)。これは葉の基部側の方が先端部側よりもゆっくりと *FIL* の発現領域の比率が減少、*PHB* 発現領域の比率が増加しているためでもある。こうした観察する発生段階や葉原基内の観察面の違いのため、発現領域が維持されるという従来の見方と本研究の結論にずれが生じたものと考えられる。

以上に述べた通り、本研究から明らかとなった *FIL* と *PHB* の発現動態は、葉の向背軸に依存した形態形成の過程についての過去の研究結果と矛盾するのではなく、見過ごされて来た側面を明らかにしていると言える。以下の節 4-1-2, 4-1-3 では *FIL* と *PHB* の発現動態を取り入れた新しい葉の発生過程モデルを考察する。

4-1-2. 葉原基の向軸側と背軸側の領域境界での側方成長

従来のモデルでは、向軸側と背軸側の性質を持つ細胞群は静的に決定されており、両方の細胞群の近接するあたりで側方への細胞増殖が活発になるので、葉原基が扁平な器官として成長すると考えられて来た。しかし *FIL* と *PHB* の発現細胞が動的に変化することがわかった以上、この側方成長の過程がどのように制御されているかをもう一度捉え直す必要がある。

まず P1 期から P2 期頃の葉原基の横断面は、円形または少し横に長い楕円形をしているが、P2 期から P3 期頃にかけて横長の三角形に近い形態となるので、この時期に側方成長が始まると言える。P2 期から P3 期には、茎頂分裂組織中央の方向を 12 時の方向として *PHB* の発現が 10 時から 2 時程度の向軸側領域、*FIL* の発現が 2 時から 10 時程度の背軸側領域に及んでいる(図 3F, H)。そして葉身が側方に突出している方向も 2 時と 10 時程度の方向となっている(図 21A)。さらにその後も周縁細胞が肥大伸長するまでは *FIL* と *PHB* の発現領域の境界が葉身先端からわずかに向軸側寄りの位置を保って葉身の成長を続けているように見えるので、先端付近の細胞が一回ずつ分裂するのと近い速度で、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界が 1 細胞ずつ側方へ移動しているものと考えられる。一方 *enf2* 変異体では *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が遅く、葉身が側方成長する方向は野生型よりも向軸側寄り(およそ 1 時と 11 時程度の方向)となっており(図 21B)、*phb-1d/+* では境界移動が速く、葉身の側方成長する方向が野生型よ

りも背軸側寄り(およそ 4 時と 8 時程度の方角)となっていた(図 21C)。これらの観察結果は、P2 期から P3 期における *FIL* と *PHB* の発現領域の境界位置付近の、主に *FIL* 発現領域側で、葉原基の中心から外側へ向かうように側方成長が起り、その後は成長方向を維持しながら、この境界移動と近い速度で側方へ細胞分裂が進んでゆくことを示唆している。

また、近年 *FIL* 発現領域と *PHB* 発現領域の境界付近の *FIL* 発現細胞で *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* 遺伝子である *WOX1* と *WOX3/PRS* が発現することで、側方への細胞増殖を促進することが知られている(Nakata et al., 2012)。またオーキシンの生合成系の *YUCCA* 遺伝子群もこれらと似た領域で発現し、側方成長を促すことが知られている(Wang et al., 2011)。しかし、この *WOX1*, *WOX3/PRS* および *YUCCA* 遺伝子群が、どのような制御を受けて適切な領域で発現するのかあまり解明されていない。もしも、これらの遺伝子が *FIL* と *PHB* の発現領域の境界付近であるという情報に依存して発現領域が制御されているとしたら、*enf2* と *phb-1d/+* で側方成長の方角が野生型と異なるという点を簡単に説明できる。この仮説を今後検証してゆくことは、*FIL* と *PHB* の発現動態と葉の形態形成を統合的に理解する上で重要な知見を与えるはずである。

4-1-3. *FIL* と *PHB* の発現動態と葉肉分化の関係

葉肉組織の向軸側は柵状組織に、背軸側は海綿状組織に分化することは双子葉植物の葉に広く見られる特徴である。従来の葉の発生モデルでは、葉原基の向軸側と背軸側の細胞群が静的に決定しており、表皮下の細胞のうち向軸側と背軸側の細胞群はそれぞれ向軸側と背軸側の細胞分化を促す遺伝子を発現し続けているので、それぞれ柵状組織と海綿状組織に分化すると考えられて来た。しかし向軸側葉肉も背軸側葉肉も当初 *FIL* を発現し、後に *PHB* を発現するようになることから、単純にどちらの遺伝子が発現したらどのような細胞分化を起こすという説明の仕方では不十分である。

この葉肉細胞の分化を決定する分子機構の一つの可能性として次のことが考えられる。葉の発生の早い段階で *FIL* の発現を止めて *PHB* を発現するように切り替わると柵状組織へと分化し、遅い段階で切り替わると海綿状組織へと分化するという考えである。この考えは今まで深く追究されて来なかった葉肉分化の側面を説明し得るという意味で興味深い。それは、葉肉は柵状組織と海綿状組織の 2 種類の組織からなると記述されることが多いが、実際には中間的な

細胞形態の領域もあり、向軸側から背軸側にかけて細胞の断面積や間隙サイズに勾配が見られるという側面である(Kerstetter et al., 2001)。こうした細かい細胞形態の差異はどの遺伝子を発現した、またはしていない、という二値的な情報で決定していると考えるのは難しいが、*FIL* から *PHB* への発現の切り替えのタイミングによって決定されているとすれば中間的な細胞分化についても単純な説明となる。また、この考えは、*enf2* と *phb-1d/+*における葉肉分化の異常をよく説明するという意味でももっともらしい。というのも、*FIL* から *PHB* への発現の切り替えが野生型より遅い *enf2* において、向軸側で柵状組織が正常に形成されずに海綿状組織に似た細胞が向軸側にまで形成され、発現の切り替えが野生型より早い *phb-1d/+*において柵状組織様の組織が比較的背軸側の方にまで広く形成されていたからである。

しかし、柵状組織と海綿状組織の分化を *FIL* と *PHB* が制御していることが強く示唆される一方で、本研究で詳細に解析していない *KAN* 遺伝子群や *AS2* などがこれらの組織分化にどの程度寄与しているのかは現時点でわからない。今後どの遺伝子がどのように葉肉分化に寄与しているかを明らかにするためには、個々の遺伝子発現レベルを任意の細胞で、かつ任意のタイミングで操作するような、これまでに無い高精度の実験系が必要であろう。

4-2. *FIL* と *PHB* の発現動態制御に関わる *PHB* 様遺伝子の役割

これまでに変異体 *phb-1d/+*の葉原基では *FIL* の発現領域が狭いことと、*PHB* の発現領域が葉原基の大半を占めるほど広いことが *in situ* hybridization の解析から報告されていた(McConnell et al., 2001)。しかし、この解析は二つのアリル *PHB^{WT}* と *PHB^{1d}*それぞれの由来の mRNA を区別できないため、単純に *PHB^{1d}*の mRNA が背軸側で miR165/166 によって分解されないために広い範囲で *PHB^{1d}*の mRNA が検出されたのか、*PHB^{WT}*も広い範囲で発現するようになっていたのか不明であった。そのため、*FIL* の発現が狭くなった原因が、*PHB^{1d}* が広い範囲で発現したことのみにあるのか、*PHB^{WT}*が広い範囲で発現して *FIL* の抑制に寄与しているのかという点も不明であった。

一方、本研究での *phb-1d/+*における *35Spro::miYFP-W* の観察結果から、*phb-1d/+*では *FIL* 発現領域と同様に miR165/166 の活性領域も野生型と比較して同じサイズの葉原基では狭くなっていることがわかった。まずこのことから、分子機構は不明だが *PHB* には *FIL* の発現と miR165/166 の活性を抑制する性

質があると言える。しかし、もし *PHB^{ld}* アリルが発現するだけで *FIL* の発現と *miR165/166* の活性が抑えられるのなら、*PHB* の転写活性を持つ領域は葉原基の大部分に及ぶと考えられるので、*FIL* の発現も *miR165/166* の活性も葉原基発生開始時からほとんど見られないはずである。実際の観察結果はそうではなく、*FIL* の発現領域と *miR165/166* の活性領域が発生初期には広い範囲で見られるが、野生型よりも速く狭くなってゆく、というものであった。つまり *FIL* の発現と *miR165/166* の活性を向軸側から次々抑制している主な要因は *PHB^{ld}* アリルだけでなく *PHB^{WT}* と、おそらく *PHV* と *REV* も含めた *PHB* 様遺伝子群の発現の総量であると推測できる。このことから、*PHB* 様遺伝子群の合計の発現レベルが向軸側の細胞から順に一定量に達してゆくことによって、向軸側の細胞から順に *FIL* の発現と *miR165/166* の活性が抑制されてゆくという分子機構が示唆される。

今後、この *PHB* 様遺伝子群が *FIL* と *miR165/166* を抑制する機能についての可能性を検証するためには、*PHB* 様遺伝子群の個々の変異体や多重変異体における *FILpro::GFP* と *35Spro::miYFP-W* の発現パターンをさらに解析する必要がある。そしてさらに強い実験的証拠を得るためには、*PHB* 様遺伝子群を任意の発生段階かつ任意の細胞で発現抑制または、あるいは発現誘導するような時間空間精度の高い実験系を必要とするであろう。

4-3. ENF2 タンパク質の分子機能

本研究から変異体 *enf2* においてプラスチド遺伝子の大部分の発現レベルが低下していたので、プラスチドタンパク質 *ENF2* はこれらのプラスチド遺伝子を葉原基において十分量発現させるために必要な機能に関わっていると考えられた。

では *ENF2* タンパク質の直接的な分子機能とは何かを考えると、*ENF2* および植物の *ENF2* ホモログの分子機能はこれまで解析された例がなく未だ答えることが難しい。*ENF2* の分子機能を議論する手がかりは今のところバクテリアの *ENF2* ホモログである *PotD*, *PotF* の研究例だけであろう。*PotD* と *PotF* は結晶構造レベルで解析が進んでおり、ペリプラズム空間に局在する *PotD* と *PotF* がポリアミンと特異的に結合し、これを ABC トランスポーターと共役して細胞内へ輸送する活性が知られている(Igarashi and Kashiwagi, 1999)。このことから、*ENF2* もプラスチドにおいてポリアミンまたは何らかの低分子物質

と特異的に結合して膜内外での輸送をしている可能性が考えられる。近年のプロテオーム解析で ENF2 がプラスチドの包膜の画分から特異的に検出されていることはこの可能性をある程度支持する(Ferro et al., 2010)。もし ENF2 が低分子物質の輸送に関わっているとすれば、その物質がプラスチド遺伝子発現の制御に関わっているのかも知れない。

また物質輸送とは別の PotD の機能として、細胞内に存在する PotD がゲノム DNA の *Pot* オペロン上流領域と結合して、転写を制御することが知られている(Antognoni et al., 1999)。このことから、ENF2 機能の可能性として、プラスチドゲノムの DNA と結合して転写制御を行っている可能性が考えられる。この可能性は、トウモロコシの ENF2 ホモログが、プラスチドゲノムとタンパク質の複合体である核様体画分から検出されているという知見からある程度支持される(Majeran et al., 2012)。ENF2 が転写制御因子として機能しているとすれば、*enf2* 変異体の葉原基でプラスチド遺伝子の発現が低下していることを単純に説明できるだろう。ただし、シロイヌナズナの核様体から ENF2 が検出されたという報告はまだ無いので、まずシロイヌナズナの ENF2 が核様体にも局在しているかどうかを明らかにすることが必要である。

以上の ENF2 タンパク質の機能に関する可能性を検証するためにも、ENF2 がポリアミンや類似の化合物と結合するか、プラスチドゲノム DNA と結合するか、といった点を生化学的に解析することが今後重要である。

4-4. プラスチド遺伝子発現と *FIL* と *PHB* の発現動態

本研究から、薬剤や変異によってプラスチド遺伝子の発現を広範に阻害すると、*enf2* のように *FIL* と *PHB* の発現動態変化や葉の形態変化が見られることがわかった。また、これらの変化が *GUN1* の変異によって抑圧されることもわかった。以下では、プラスチド機能と葉の発生や核遺伝子の発現制御との関係を議論した過去の研究例と本研究の結果との比較を行い、プラスチド機能によって葉の形態形成が影響を受けることの意義と今後の課題について考察する。

4-4-1. プラスチド遺伝子発現と葉の形態形成の関係についての過去の知見

プラスチドの状態、特にプラスチド遺伝子の発現に関わる機能、が変化した場合に葉の発生過程に変化が見られるという知見は以前から報告されてきている。シロイヌナズナに限らず、タバコ、キンギョソウ、トマトにおいてもプラ

スチド遺伝子発現に関わる遺伝子の様々な変異体で共通して、柵状組織が正常に形成されずに向軸側葉肉が海綿状組織に似た組織形態になることと、葉身の幅が狭く先端の尖った形態の葉になること、の一方または両方が報告されている(Chatterjee et al., 1996; Keddie et al., 1996; Babiychuk et al., 1997; Hricová et al., 2006; Babiychuk et al., 2011; Fleischmann et al., 2011; Moschopoulos et al., 2012; Lee et al., 2012)。これらの葉肉分化と葉身形態の異常は *enf2* と共通した特徴であることから、*enf2* と同様の分子機構を介して現れている発生異常である可能性が高い。

これらの葉の発生異常の原因として先行研究で議論されて来たのは、プラスチド機能異常によって植物ホルモンであるオーキシシンやアブシジン酸の代謝が変化する可能性(Fleischmann et al., 2011; Lee et al., 2012)や、*KAN1* や *ETT* が強く発現するためとする可能性である(Moschopoulos et al., 2012)。中でもアブシジン酸については、プラスチドリボソーム形成の異常な変異体 *rh3* においてアブシジン酸の蓄積量が低下し、ここにアブシジン酸を投与すると、細く鋸歯の発達した葉の形態が野生型様の形態へと回復したと報告されている(Lee et al., 2012)ので、アブシジン酸がプラスチド状態に応じた葉の形態形成に関わっていることは明確に示されている。一方その他の、オーキシシン代謝と *KAN1*, *ETT* の発現については、プラスチド遺伝子発現の異常によってこれらに変化が生じ、葉肉分化や葉の形態に影響を与えるということの明確な証拠は未だ報告されておらず、今後さらなる解析結果が待たれている。

これに対して本研究では、プラスチド遺伝子の転写と翻訳がリンコマイシン処理やエリスロマイシン処理、*FLV* 遺伝子の変異、そしておそらく *ENF2* 遺伝子の変異によって阻害されると、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が野生型よりも遅れることが示された。このことは上記の先行研究におけるプラスチド遺伝子発現が異常な変異体においても、同様の *FIL* と *PHB* の発現異常が生じていた可能性を強く示唆する。さらにこの *FIL* と *PHB* の発現動態の異常が葉肉分化の異常や細い葉の形態につながったということが強く示唆される。ただし、本当にこの *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が遅くなったことと、柵状組織の分化異常および葉の幅の減少とは、現時点では相関関係が見られているだけであり、因果関係については断言できない。今後この因果関係を厳密に検証するためには、技術的に困難ではあるが、プラスチド遺伝子発現が阻害されているような状況下で *FIL* と *PHB* の発現を人為的に操作して野生型様の発現動態

を起こさせ、柵状組織の分化や葉の形態が野生型様になるかどうかを調べる必要があるだろう。

また、上述の変異体 *rh3* にアブシジン酸を投与することで葉の形態異常が回復したという研究例(Lee et al., 2012)から、*enf2* や *flv*、リンコマイシン処理、エリスロマイシン処理時における葉の形態異常もアブシジン酸投与で回復する可能性が示唆される。もしこの可能性が正しければ、*FIL* と *PHB* の発現動態とアブシジン酸代謝との間に因果関係があることが期待されるので、この可能性を検証していくことで *FIL* と *PHB* の発現動態の制御機構の理解が深まるであろう。

このように過去の研究例と本研究の結果を統合的に理解する研究が今後必要であるが、一方でどの研究例でもほとんど明らかにされていない問題が残っている。それはプラスチド遺伝子の発現の結果としてどのようなプラスチド機能が働くことが、葉の形態形成、あるいは *FIL* と *PHB* の発現動態制御に関わっているのかという問題である。一つの可能性としてはプラスチドにおける光合成以外の何らかの代謝機能が十分でないと葉の形態異常、*FIL* と *PHB* の発現異常が生じるという可能性が挙げられる。例えばプラスチド遺伝子のうち脂質代謝に関わる *accD* の発現は、葉の正常な展開に必要であることがタバコにおいて知られている(Kode et al., 2005)。ただし本研究の結果からは、*accD* の発現低下が *enf2* だけでなく *enf2* 様の表現型を示さないノルフラゾン処理植物においても見られた。このため、*accD* の発現低下だけから葉の形態異常、*FIL* と *PHB* の発現異常が起きたという説明はできず、少なくとも他のプラスチド遺伝子の発現低下との複合的影響を考慮すべきである。また、現時点でプラスチドの特定の遺伝子発現や特定の代謝機能が重要だとする根拠は無く、別の可能性の一つとして、プラスチドにおけるタンパク質の総量がアミノ酸配列に関係なく重要であるという可能性さえ現時点では否定できない。これらの可能性を検証するためには、プラスチドの遺伝子発現が阻害された植物において、特定のプラスチド機能を回復させることで葉の形態異常を回復させるという実験が必要である。例えばリンコマイシン処理によりプラスチドのタンパク質合成が阻害された状況下で、一部のプラスチド遺伝子を核コードの遺伝子として発現させてタンパク質をプラスチド内へと輸送し、葉の形態を回復させるという実験が考えられる。あるいは、プラスチド遺伝子発現の阻害下で代謝が低下している化合物を外生的に投与することで葉の形態を回復させられる可能性が考えられる。

このようなプラスチド遺伝子や化合物を探索することで、葉の形態形成に関わるプラスチド機能の解明につながると期待される。

4-4-2. プラスチドの状態に応じた核の遺伝子発現制御についての過去の知見

プラスチド機能がリンコマイシンやノルフラゾン処理で異常になったとき、非常に多くの核遺伝子が発現変動することは近年知られている(Koussevitzky et al., 2007; Ruckle et al., 2012)。しかし、核遺伝子の中でもプラスチドの状態に応じて発現制御されるものとして、研究の歴史が長く詳しく解析されて来たのは、主に集光性タンパク質複合体のサブユニットや Rubisco 小サブユニットなどをコードする光合成関連の遺伝子である。これら光合成関連の核遺伝子の発現制御に関わる因子として *GUN1* や *GUN2-5* が単離、解析されてきた。そしてこれまでに知られている重要な知見として、プラスチドの機能が薬剤処理や変異で阻害されたときに転写因子 ABI4 の発現が誘導され、別の転写因子 GLK1 の発現が抑制され、これらの転写因子によって、光合成関連の遺伝子の多くが転写制御されることが知られている(Koussevitzky et al., 2007; Kakizaki et al., 2009)。また、プラスチドにアンカーされるタンパク質 PTM が、プラスチド機能が阻害されたときには *GUN1* 依存的に切断されて核に移行し、転写因子 ABI4 の発現を誘導することも最近報告された(Sun et al., 2011)。しかし、この *GUN* 遺伝子群に関わる核の遺伝子制御系が、プラスチド遺伝子発現が異常になったときの葉の形態変化にも関わっているかどうかという点は今まで解析されて来なかった。

一方、本研究の結果から、リンコマイシン処理や *enf2* 変異によって *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動が遅延し、葉の形態が細くなるという影響は *GUN5* には依存せず、*GUN1* に依存していることがわかった。これはプラスチドの遺伝子発現状態に応じた *GUN1* 依存的な核遺伝子の制御系の新たな側面を示している。それはこの核遺伝子の制御系が、個々の細胞の光合成活性を調節するなどの細胞内の過程を制御するだけでなく、向背軸に沿った遺伝子発現パターン制御という細胞間の相互作用に関与するという側面である。この側面を示している点で、本研究の結果はこの *GUN1* 依存的な核遺伝子制御系がどのような生命現象に関わるのかという問題の理解を広げる重要な知見である。しかしここで、光合成関連遺伝子群を制御するように PTM, ABI4, GLK1などを介した転写制御によって、*FIL* や *PHB* の転写、また miR165/166 の発現や活性に関わる

遺伝子の転写を制御しているのかどうかは現時点で不明であり、この制御過程を解明することは今後の課題である。

4-4-3. プラスチド異常時に葉の形態形成を変化させることの意義

これまで、プラスチド遺伝子発現が阻害されたときに葉の形態が細くなるなど変化が生じるのは、単に様々な細胞機能が重篤に阻害されたために非特異的な影響が出て発生過程がうまく進まなかったのか、植物の生存戦略上何らかの意義があつてそのように発生過程を変化させているのかはわかっておらず、深く議論されて来なかった。この問題はある程度概念的であるので過去の知見からも本研究の結果からも明確に答えることは難しい。

しかしリンコマイシン処理時や *enf2* における葉の形態変化が *GUN1* 一遺伝子の変異によって抑圧された点は示唆深い。もし、様々な細胞機能の重篤な阻害が形態異常の原因であつたなら、*gun1* 変異一つがそれらの重篤な機能阻害全てを回復させたことになるが、それは考えにくい。むしろ、この *GUN1* 一遺伝子の機能欠損で形態異常を抑圧できるという事実の解釈としては、葉の形態形成が *GUN1* 依存的に「制御」された結果として葉が細くなる、という考え方が自然ではないだろうか。

さらに、*GUN1* の変異によって葉の発生過程で葉緑体を形成する機能と生存能力は *GUN1* 変異によってより低下することも *GUN1* の重要な機能を示している。それは、外的かく乱や遺伝子の変異によって葉原基のプラスチド遺伝子発現が阻害された時に、葉緑体の形成と生存能力は阻害され易いのだが、*GUN1* の機能に依ってこの阻害効果に対抗して生存を維持するということである。この外的かく乱や遺伝子の変異によるプラスチド遺伝子発現の阻害という状況は、本研究においては人為的な変異(*enf2*, *flv*)や薬剤処理(リンコマイシン, エリスロマイシン)によって引き起こされたものであるので、野生環境においてどの程度起きているのかは依然不明である。しかし、強光ストレスを与えたときに *gun1* 変異体の葉が部分的に白化するという報告(Ruckle et al., 2007)もあり、野生環境下で *GUN1* が葉緑体の形成阻害を防いでいる可能性は容易に想像できる。

もしもプラスチド遺伝子発現が阻害されたときに *GUN1* 依存的に *FIL* と *PHB* の発現動態を遅延させることや、葉を細くさせることも、そのような適応的意義のある制御の結果だとすれば、次のような可能性が考えられる。まず、葉原基においてプラスチド遺伝子発現システムが正常に機能しているなら、光

合成装置をもつ葉緑体を発達させながら、*FIL* と *PHB* の発現領域を正常に変化させてゆくことで葉身を広く平面的に展開させ、形態的にも葉緑体の状態的にも光合成効率の高い葉が形成される(図 22A)。しかし、プラスチド遺伝子発現システムに異常を生じている場合には、その後発生の過程で正常な光合成能力を持った葉緑体を形成できない可能性がある。実際、一定濃度以上のリンコマイシン、エリスロマイシン処理によって葉は白化し、*enf2-1* や *enf2-2* の変異によって葉緑体の形成は部分的にまたは完全に阻害されている。その際、*FIL* と *PHB* の発現領域変化を正常に進行させて葉を広く展開しても、光合成能力の不十分な葉緑体しか持たない葉になり、光合成の恩恵を受けられないばかりか、葉を形成するコストがかかって成長、生存には不利な状況となる(図 22C)。このような状況を防ぐためにはプラスチド遺伝子発現の異常に応じて *GUN1* 依存的な核遺伝子制御系を働かせ、葉の幅広い展開を防ぐことは一定の効果があるだろう(図 22B)。

このような意義があって細い葉の形成が起こるという可能性は、現時点では単なる可能性に留まる。しかし、今後の研究で野生の生育条件でどの程度プラスチド遺伝子の発現がかく乱されるのか、野生条件の植物の成長や稔性が *GUN1* 機能の有無や強弱でどの程度違うのかを調べることで議論が進むと期待される。

4-5. *FIL* と *PHB* の発現動態と似た振る舞いをする数理モデルの解析

序論で述べた通り、葉原基における向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の発現領域は、その遺伝子群自身の相互抑制的な発現制御によって形成および維持されるという考えが以前から提唱されてきた。この考えとは対照的に、今回向軸側の *PHB* の発現領域と *FIL* の発現領域はごくわずかな重複をもって向軸側と背軸側に分かれているがその境界位置が発生に伴って背軸側へ移動してゆくことを見出した。しかし、本研究の結果は向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群が相互抑制的であることは否定していない。少なくとも *miR165/166* が *PHB* 様遺伝子群の mRNA を切断することはよく知られた事実であり(Mallory et al., 2004)、逆に *PHB* 様遺伝子群が *miR165/166* の発現または活性を抑える機構もいくつかの先行研究から示されている(Dello Ioio et al., 2012; Brandt et al., 2013)。一方 *FIL* と *PHB* 様遺伝子の制御関係は現時点で不明な点が多いものの、*PHB* 様遺伝子が *FIL* を抑えることは本研究および他の遺伝学的研究から示され

ているし(Siegfried et al., 1999)、逆に *FIL* は *KAN1*, *ARF4* といった *PHB* 様遺伝子を抑制する遺伝子の発現を促進することも知られている(Bonaccorso et al., 2012)。さらに序論で述べた通り、*PHB* 様遺伝子と *miR165/166* および *FIL* の間の相互抑制には、*miR165/166* を含めて細胞間を移動して作用する因子が関わっている。このように二つの遺伝子群の間に細胞間での相互抑制的な制御関係があるとき、二つの発現領域が分かれながらその境界が移動するという現象は容易に説明できるのだろうか。あるいは、単純な相互抑制よりもさらに複雑な制御関係を考えなければ説明できないのだろうか。この問題は、直ちに実験的に検証するのが難しい。

一方で、数理学的研究から、二つ以上の因子が相互抑制的に働く場合、それによって一つの因子が優勢に存在している空間領域と、もう一つの因子が優勢に存在している空間領域が分かれ得るが、それらの因子が空間を移動する場合には、その境界位置は容易に一方向へ移動するという現象が知られている。これは、実際に生態学的研究において競合種の生息域の境界が移動する現象や、ハエの初期胚における遺伝子発現領域の境界が移動する現象を説明するのに用いられる理論である(Murray, 2003; Jaeger et al., 2004)。また二つ以上の移動性因子群が相互抑制的に働くにもかかわらず二つの領域の境界位置が安定に固定されているという観察事実があった場合には、特別な仮定を置かなければ境界位置が移動しないことを説明できないという場合さえある(Jilkin et al., 2007)。

こうした数理学的知見と本研究での観察結果を受けて、*FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動を、相互抑制的な二つの移動性因子の振る舞いとして数理モデルによって模倣することができると考えられた。そのような観察事実を模倣するためのモデルは必ずしも正確に現象を記述するモデルとはならないものの、今後本研究の成果をさらに発展させてゆく上で有効な作業仮説を与えるものと期待される。そこで、以下の通り数理モデルを構築して数値計算と考察を行った。

4・5-1. 二つの相互抑制的な因子による、遺伝子発現領域の境界移動を模倣するモデルの構築

二つの移動性因子の名前を向軸側(adaxial)因子 *AD* と背軸側(abaxial)因子 *AB* として呼ぶ。概念的には *AD* は、*PHB* およびその下流で *FIL* と *miR165/166* の発現、活性を抑制する因子群の総体であり、*AB* は、*FIL* と *miR165/166* 自身と、

FIL の下流で *PHB* の発現、活性を抑制する因子群の総体である。*AD* と *AB* は以下の4つの仮定を満たすものとした。

1. *AD* と *AB* は互いの合成速度を低下させ分解速度を上昇させる活性がある。
(図 23A)

2. *AD* と *AB* は細胞内では常に均一に分布しており、細胞間の移動は濃度の高い細胞から低い細胞へと移動することで、単純な拡散とよく似た移動をする。(図 23A)

3. すべての細胞における *AD* と *AB* の合成と分解と移動に関するパラメータは同じ値で固定されている。つまり、どの細胞も空間的位置と時間によらず同一の遺伝子発現制御ネットワークを持つ。

4. 単純化して考えるため、細胞6個だけが縦に並んで接している空間を仮定する。この縦方向が向背軸の方向である。

これらの仮定を総合して、向軸側から i 番目の細胞における *AD* と *AB* の濃度 (AD_i と AB_i) の時間変化を以下の微分方程式でモデル化した。

$$\frac{dAD_i}{dt} = f_1(AB_i) - g_1(AB_i) \cdot AD_i + D_{AD}(AD_{i-1} + AD_{i+1} - 2AD_i) \quad (1)$$

$$\frac{dAB_i}{dt} = f_2(AD_i) - g_2(AD_i) \cdot AB_i + D_{AB}(AB_{i-1} + AB_{i+1} - 2AB_i) \quad (2)$$

$$(i = 1, 2, 3, 4, 5, 6)$$

ここで、式(1)と(2)ともに右辺の第一項が時間あたりの合成量、第二項が時間あたりの分解量、第三項が細胞間の移動による流入と流出を表す。関数 f_1 と f_2 はそれぞれ *AD* と *AB* の合成速度で、単調減少の関数である。関数 g_1 と g_2 はそれぞれ *AD* と *AB* の分解速度についての関数で、単調増加関数である。*AD* と *AB* の分解速度は自身の濃度にも比例する。 D_{AD} と D_{AB} は *AD* と *AB* の拡散係数である。関数 f と g は、単純化するため、次の式(3)と(4)の通り定数(第一項)とヒル式(第二項)の和で表現した(第二章 2-14 節参照)。

$$f_j(z) = p_j + r_j \cdot \frac{1}{1+z^2} \quad (3)$$

$$g_j(z) = d_j + c_j \cdot \frac{z}{1+z} \quad (4)$$

$$(j = 1, 2)$$

ここで、定数 p は基礎合成速度、 r は相互の合成抑制効果の大きさである。定

数 d は基礎分解速度、 c は相互の分解促進効果の大きさである(図 23B, C)。

まず、式(1)と(2)の拡散項(第三項)を除いて相平面上にヌルクラインを描くと、一定のパラメータ範囲において、図 23D の通り 2 点だけ安定な定常状態が存在することがわかる。この 2 点とは AD を高発現し、 AB をほとんど発現していない状態(AD 発現状態, 図 23D マゼンタの丸印)と、 AB を高発現し、 AD をほとんど発現していない状態(AB 発現状態, 図 23D 緑の丸印)である。安定な定常状態がこの 2 点だけであることが意味するのは、近隣の細胞からの影響が無い場合、個々の細胞は AD 発現状態か AB 発現状態のどちらか一方の状態しか、安定な状態としては取りえないということである。

そこで、これらの AD , AB 発現状態を PHB 発現状態と FIL 発現状態に見立てて二つの遺伝子発現状態が維持されるのか、切り替わってゆくのかを調べるため、初期値として向軸側 3 細胞を AD 発現状態に、背軸側 3 細胞を AB 発現状態に設定した後、式(1)と(2)に従う逐次計算によって AD と AB の発現の時間変化をシミュレーションした。まず、 AD と AB の間でパラメータが対称な場合($p_1 = p_2$, $r_1 = r_2$, $d_1 = d_2$, $c_1 = c_2$, $D_{AD} = D_{AB}$)には、 AD 発現領域と AB 発現領域の境界付近の細胞では拡散の影響により AD と AB の発現量がある程度中間的な値をとるが、一方の発現状態から他方の発現状態へ細胞が切り替わることはない(図 23E)。つまりこのとき AD と AB の発現領域の境界位置は移動しない。一方、こうした対称なパラメータセットから一つのパラメータのみを増減させて非対称にした場合には境界付近の細胞から順に次々 AD と AB の発現状態が切り替わる。例えば、図 23F のように r_1 を小さくして $p_1 = p_2$, $r_1 < r_2$, $d_1 = d_2$, $c_1 = c_2$, $D_{AD} = D_{AB}$ とした場合には AD 発現状態の細胞が AB 発現状態へ次々切り替わる、つまりは発現領域の境界が向軸側へ移動してゆく。逆に、図 23G のように r_2 を小さくして $p_1 = p_2$, $r_1 > r_2$, $d_1 = d_2$, $c_1 = c_2$, $D_{AD} = D_{AB}$ とした場合には AB 発現状態の細胞が AD 発現状態へと次々切り替わる、つまりは領域境界が背軸側へ移動してゆく。この境界が移動する方向は、初期状態の AD 発現細胞と AB 発現細胞の数が 3 細胞ずつでない場合にも変わらず、例えば初期状態の AD 発現細胞を向軸側の 1 細胞、 AB 発現細胞を残りの 5 細胞としてシミュレーションした場合にも、図 23G のように $p_1 = p_2$, $r_1 > r_2$, $d_1 = d_2$, $c_1 = c_2$, $D_{AD} = D_{AB}$ というパラメータセットであれば同様に境界が背軸側へ移動する(図 24A)。

さらに r_2 だけでなく p , r , d , c のパラメータをさまざまに変化させた結果を図 23H, I, J および K に示してある。この結果から、 AD と AB の発現に関わるパラ

メータが完全に対称な場合には境界位置が移動しないが、わずかでも *AD* が発現しやすいパラメータのもとでは境界位置は背軸側へ移動し、*AB* が発現しやすいパラメータのもとでは境界位置が向軸側へ移動するという性質が見て取れる(図 23H, I, J, K)。

実際の葉原基における向軸側と背軸側の遺伝子群は異なるタンパク質や低分子 RNA をコードしているので、両者の合成速度や分解速度にはいくらか差があると考えるのが自然である。つまり、この数理モデルと本質的に同様の機構で *FIL* と *PHB* の発現領域の境界が移動しているという可能性は十分考えられる。当然、現時点では *FIL* と *PHB* の発現領域の境界移動を説明するモデルは他にいくつも考えうるであろう。たとえばこの境界位置を濃度依存的に規定するような未知のモルフォゲンのようなものを想定すれば、そのモルフォゲン様因子の量や細胞の応答性が発生に伴って変化することで境界位置が変化するという説明も成り立つ。しかし、この相互抑制的 2 因子の数理モデルは、そうした未知の因子を想定せずに境界移動を説明できるという意味で、もっとも単純なモデルの一つである。

4-5-2. 相互抑制的な 2 因子モデルと変異体表現型との比較

上述の通り、二つの相互抑制的な移動性因子に振る舞いによって、一方の発現領域と他方の発現領域の境界位置が一方へ移動する、という数理モデルが構築できた。そこで次にこのモデルで野生型と変異体の表現型の違いを説明できるかどうかを調べてみた。

まずこの数理モデルが *phb-1d/+* で見られた野生型よりも速く *FIL* 発現細胞が *PHB* 発現細胞へと切り替わってゆく様子を再現できるか調べてみた。これを再現するとは、*phb-1d* 変異のように *AB* による *AD* の分解促進効果を低下させた場合に細胞状態の切り替わりがより速まるということである。ここでは上述の図 24A で用いたパラメータセットを便宜的に仮想的野生型として、*AB* による *AD* の分解促進効果 c_I を低下させてみた。その結果期待通り *AB* 発現細胞が *AD* 発現状態へより速く切り替わることがわかった (図 24B)。つまりこの数理モデルは単純ながら *phb-1d/+* の表現型とは整合性を示す。

一方プラスチド遺伝子発現の阻害の効果がどのように *FIL* と *PHB* の発現動態に影響するのかを議論するのは非常に困難である。それはプラスチドの遺伝子発現阻害の影響が *AD* と *AB* として想定している遺伝子群のどれにどのように影

響しているのか、基礎合成量に影響するのか、相互抑制関係に変化を与えるのか、といった点が現時点で不明なので、どのパラメータを変化させるべきか判断できないからである。そこで、ここではもう少し広い視点から、*AD* と *AB* の両方ともに同程度のごくわずかなパラメータ変化を全細胞で与えた場合でも、*AB* 発現状態から *AD* 発現状態への切り替わりが遅くなるかどうか、を調べた。というのも、*ENF2* は茎頂分裂組織と葉原基の全細胞で発現していることが知られていること(爲重 2009 修士論文)と、リンコマイシンやエリスロマイシンを培地に投与した場合に向軸側と背軸側の細胞に非特異的に阻害効果を持つと期待されること、また *enf2* 変異体において向軸側と背軸側に特異的な遺伝子群の発現レベルが qRT-PCR で調べた限りごくわずかしき変化を検出できなかったこと、がその理由である。もしも、*AD* と *AB* の遺伝子群の発現がごくわずかずつしか違わないのに、*enf2* などを模倣するように *AB* 発現状態から *AD* 発現状態への切り替わりが遅くなるなら、それはプラスチド遺伝子発現の阻害の効果を説明するための興味深い仮説となる。そこで先の *phb-1d/+* の再現と同様に仮想的な野生型パラメータセットから、*AD* と *AB* のパラメータを同程度変化させてみた。まず *AD* と *AB* の基礎合成速度 p_1, p_2 を $p_1 = p_2$ という関係を保ったまま低下させてみたところ *AB* 発現細胞が *AD* 発現状態へと切り替わるのが遅くなった(図 24C)。次に *AD* と *AB* の基礎分解速度 d_1, d_2 を $d_1 = d_2$ と等しく保ったまま低下させてみたところ、これも *AD* と *AB* の発現が切り替わるのが遅くなった(図 24D)。また、*AD* と *AB* の細胞間の拡散係数を $D_{AD} = D_{AB}$ と等しく保ったまま低下させてみたところ、この場合も *AD* と *AB* の発現が切り替わるのが遅くなった(図 24E)。これらのシミュレーション結果は、*FIL* と *PHB*, miR165/166 を含む向軸側と背軸側の転写因子群と低分子 RNA およびそれらの制御関係を媒介する因子群について、合成速度や分解速度、あるいは細胞間の移動効率がわずかずただけ非特異的に減少した場合にも *FIL* と *PHB* の発現の切り替わりが遅くなる可能性を示唆している。

こうしたプラスチドの状態変化による非特異的な影響の可能性というのは、十分考慮に値する。というのも、プラスチド異常の植物ではサイトゾルのリボソームタンパク質をコードする核遺伝子発現がさまざまに変化することや、原形質連絡の透過性に関わると見られる核遺伝子の発現が変化することが近年知られているからである(Ruckle et al., 2012; Burch-Smith et al., 2011)。またこの非特異的な影響によって向背軸に沿った遺伝子発現が異常になるという可能

性は、近年多く報告される分子機構が不明の現象についても示唆を与える。それは細胞質のリボソームタンパク質の変異体や、核ゲノムのヒストン修飾を広範に制御する因子の変異体、プロテアソームサブユニットの変異体などで、葉原基の *FIL* 発現領域が広く見え、葉が部分的に背軸側化するという現象である (Yao et al., 2008; Kojima et al., 2011; Ueno et al., 2007; Huang et al., 2006)。これらの変異体においてもまた、向軸側と背軸側の転写因子群や低分子 RNA などの合成や分解の機能が非特異的にわずかながら低下しているのかも知れない。ただし、こうした向軸側と背軸側両方の遺伝子群の発現にわずかながら影響して *FIL* と *PHB* の発現動態が変化するという可能性は、現時点であくまで仮説であり、今後実験的、理論的検証がさらに必要である。

今後はまずこの数理モデルがどの程度正しいか評価し、改良するため、理論と実験の比較が重要である。たとえば数理モデルにおいてパラメータ変化を加えたシミュレーション結果と、そのパラメータ変化に相当する変異体や遺伝子過剰発現体における実際の *FIL* と *PHB* の発現動態とを比較することで、ある遺伝子が *AD* に相当するのか *AB* に相当するのか、またはどちらにも当てはまらずモデルが不十分であるのか、といった議論ができる。その一方で *enf2* やリンコマイシン処理時における *FIL* と *PHB* の発現変化の遅延が、向軸側と背軸側両方の多数の遺伝子の非特異的な変動によるという可能性も興味深い課題である。この可能性が正しいならば *enf2* 変異やリンコマイシン処理の影響が、これら転写因子群や低分子 RNA の個々の変異や過剰発現によって、劇的に抑圧されず、どれとも相加的な影響しか示さないと期待される。今後は、まずそうした多重変異体の解析を一つ一つ進めてゆくことが重要であろう。

4-6. 結語

最後に、本研究ではこれまで深く議論されずに済まされてきた「向軸側と背軸側の性質を与える遺伝子の発現領域が維持される」という概念的な枠組みが、*FIL* と *PHB* の発現動態についてはあてはまらず、これらの遺伝子発現が葉の発生とともに動的に変化している側面を明らかにした。さらに変異体を用いた研究から、この動的な発現変化が形態形成における重要な制御過程であるという点が強く示唆された。今後はさらにこの *FIL* と *PHB* の発現動態を引き起こすメカニズムの解明をめざすとともに、これを他の遺伝子の発現動態と比較してゆくことが求められる。そうした研究の中で、向背軸に従った遺伝子発現パタ

ーンについての、従来の静的な枠組みに代わる、新たな動的な枠組みが確立され、葉の発生過程の深い理解につながると期待される。

また、プラスチド遺伝子発現が阻害されたときに、葉の展開が阻害されるという、これまでメカニズムが不明であった現象を一部解明することができたことも、大きな収穫であった。この発見は、葉の向背軸に依存した形態形成過程がプラスチドの状態に応じて適応的に制御されているという新しい概念を提示する。この概念は、進化的な次の二つの観点から非常に興味深い。一つは種子植物が進化の過程で、平面的で向背軸に沿って非対称な葉の形態を獲得するとき、*FIL* と *PHB* などの転写因子群を向背軸に沿って特異的に発現させる機構を発達させたことが必要条件だったと考えられていること (Sanders et al., 2007)。このとき *FIL* などの *YABBY* ファミリーの遺伝子群は同時期に新規に獲得され、一方 *PHB* 様遺伝子群や他の向軸側、背軸側に特異的な転写因子および低分子 RNA は以前から存在していたが、それらの制御関係が葉の発生システムとして再編成されたと言われている (Floyd and Bowman, 2007)。もう一つの観点は、葉の平面的で非対称な形態が進化的に獲得されたことの適応的意義は、光合成効率を高めることにあったことである。つまり、葉の発生過程で光合成装置を発達させることが保証されていなければ、プラスチドに異常のあるときには光合成活性の低い無駄な葉の展開が起り、葉を形成したコストだけ適応度が低下すると予想できる。こうしたリスクに対応するために、葉の発生初期のプラスチド遺伝子発現に異常があって光合成装置の発達が保証できない場合には、*FIL* と *PHB* の発現動態を制御して葉の展開を防ぐ、という本研究から示唆される制御機構は有効であろう。ここで、種子植物が平面的な葉の形態を獲得した時期に、プラスチドの状態に応じて *FIL* や *PHB* の発現が制御されるという機構が既に働いていたかどうかはわからないが、*GUN1* と相同性を示す遺伝子がコケ植物であるヒメツリガネゴケなどにも見られる (NCBI, <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>) ことから、可能性としては考慮する価値がある。

このように進化的観点に立って考えると、プラスチドの状態に応じて向背軸に沿った遺伝子発現パターンを制御する機構が無ければ、平面的で非対称な葉を形成する戦略は必ずしも適応的でなくなり、そもそも葉の形態が現在のように進化しなかったかも知れないという可能性すら想像できる。こうした観点から私は、植物の進化の歴史を理解する上で、向背軸に沿った遺伝子発現パターンがプラスチドの状態に応じて変化する機構がどのように獲得されてきたかと

いう問題は、平面的で非対称な葉の形態がどのように進化してきたかという問題と切り離せない重要な問題かもしれないと考えている。この可能性を検証するためにも、またプラストドの状態に応じた葉の形態制御機構がどのように進化してきたのかを知るためにも、類似の制御機構が様々な種子植物やシダ、コケ植物にも見られるかどうかを探ってゆくことは大きな意味を持つ。

本研究を契機として、これまで接点の少なかったプラストド機能の研究と葉の発生研究を融合し、新たな研究領域が発展することが強く期待される。

参考文献 (本文中登場順)

Sussex IM (1989) Developmental programming of the shoot meristem. *Cell* 56: 225-229.

Long J, Barton MK (2000) Initiation of axillary and floral meristems in *Arabidopsis*. *Dev Biol* 218: 341-353.

Lyndon RF (1998). *The Shoot Apical Meristem: Its Growth and Development*. Cambridge, UK: Cambridge University Press.

Kidner CA, Timmermans MC (2010) Signaling sides adaxial-abaxial patterning in leaves. *Curr Top Dev Biol* 91: 141-168.

Efroni I, Eshed Y, Lifschitz E (2010) Morphogenesis of simple and compound leaves: a critical review. *Plant Cell* 22: 1019-1032.

Szakonyi D, Moschopoulos A, Byrne ME (2010) Perspectives on leaf dorsoventral polarity. *J Plant Res* 123: 281-290.

Yamaguchi T, Nukazuka A, Tsukaya H (2012) Leaf adaxial-abaxial polarity specification and lamina outgrowth: evolution and development. *Plant Cell Physiol* 53: 1180-1194.

McConnell JR, Barton MK (1998) Leaf polarity and meristem formation in *Arabidopsis*. *Development* 125: 2935-2942.

McConnell JR, Emery J, Eshed Y, Bao N, Bowman J, et al. (2001) Role of *PHABULOSA* and *PHAVOLUTA* in determining radial patterning in shoots. *Nature* 411: 709-713.

Mallory AC, Reinhart BJ, Jones-Rhoades MW, Tang G, Zamore PD, et al. (2004) MicroRNA control of *PHABULOSA* in leaf development: importance of pairing to the microRNA 5' region. *EMBO J* 23: 3356-3364.

Lin WC, Shuai B, Springer PS (2003) The *Arabidopsis* *LATERAL ORGAN BOUNDARIES*-domain gene *ASYMMETRIC LEAVES2* functions in the repression of *KNOX* gene expression and in adaxial-abaxial patterning. *Plant Cell* 15: 2241-2252.

Xu L, Xu Y, Dong A, Sun Y, Pi L, et al. (2003) Novel *as1* and *as2* defects in leaf adaxial-abaxial polarity reveal the requirement for *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* and *ERECTA* functions in specifying leaf adaxial identity. *Development*. 130: 4097-4107.

Prigge MJ, Otsuga D, Alonso JM, Ecker JR, Drews GN, et al. (2005) Class

III homeodomain-leucine zipper gene family members have overlapping, antagonistic, and distinct roles in *Arabidopsis* development. *Plant Cell* 17: 61-76.

Emery JF, Floyd SK, Alvarez J, Eshed Y, Hawker NP, et al. (2003) Radial patterning of *Arabidopsis* shoots by class III HD-ZIP and KANADI genes. *Curr Biol* 13: 1768-1774.

Fu Y, Xu L, Xu B, Yang L, Ling Q, et al. (2007) Genetic interactions between leaf polarity-controlling genes and *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* in *Arabidopsis* leaf patterning. *Plant Cell Physiol* 48: 724-735.

Huang W, Pi L, Liang W, Xu B, Wang H, et al. (2006) The proteolytic function of the *Arabidopsis* 26S proteasome is required for specifying leaf adaxial identity. *Plant Cell* 18: 2479-2492.

Pinon V, Etchells JP, Rossignol P, Collier SA, Arroyo JM, et al. (2008) Three *PIGGYBACK* genes that specifically influence leaf patterning encode ribosomal proteins. *Development* 135: 1315-1324.

Yao Y, Ling Q, Wang H, Huang H. (2008) Ribosomal proteins promote leaf adaxial identity. *Development* 135: 1325-34.

Yang L, Huang W, Wang H, Cai R, Xu Y, et al. (2006) Characterizations of a hypomorphic *argonaute1* mutant reveal novel *AGO1* functions in *Arabidopsis* lateral organ development. *Plant Mol Biol* 61: 63-78.

Nakagawa A, Takahashi H, Kojima S, Sato N, Ohga K, et al. (2012) Berberine enhances defects in the establishment of leaf polarity in *asymmetric leaves1* and *asymmetric leaves2* of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Mol Biol* 79: 569-581.

Li H, Xu L, Wang H, Yuan Z, Cao X, et al. (2005) The Putative RNA-dependent RNA polymerase *RDR6* acts synergistically with *ASYMMETRIC LEAVES1* and *2* to repress *BREVIPEDICELLUS* and MicroRNA165/166 in *Arabidopsis* leaf development. *Plant Cell* 17: 2157-2171.

Ishibashi N, Kanamaru K, Ueno Y, Kojima S, Kobayashi T, et al. (2012) *ASYMMETRIC-LEAVES2* and an ortholog of eukaryotic NudC domain proteins repress expression of *AUXIN-RESPONSE-FACTOR* and class 1 *KNOX* homeobox genes for development of flat symmetric leaves in

Arabidopsis. Biol Open 1:197-207.

Ueno Y, Ishikawa T, Watanabe K, Terakura S, Iwakawa H, et al. (2007) Histone deacetylases and ASYMMETRIC LEAVES2 are involved in the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis*. Plant Cell 19: 445-457.

Sawa S, Watanabe K, Goto K, Liu YG, Shibata D, et al. (1999) *FILAMENTOUS FLOWER*, a meristem and organ identity gene of *Arabidopsis*, encodes a protein with a zinc finger and HMG-related domains. Genes Dev 13: 1079-1088.

Siegfried KR, Eshed Y, Baum SF, Otsuga D, Drews GN, et al. (1999) Members of the *YABBY* gene family specify abaxial cell fate in *Arabidopsis*. Development 126: 4117-4128.

Stahle MI, Kuehlich J, Staron L, von Arnim AG, Golz JF (2009) *YABBY*s and the transcriptional corepressors *LEUNIG* and *LEUNIG_HOMOLOG* maintain leaf polarity and meristem activity in *Arabidopsis*. Plant Cell 21: 3105-3118.

Sarojam R, Sappl PG, Goldshmidt A, Efroni I, Floyd SK, et al. (2010) Differentiating *Arabidopsis* shoots from leaves by combined *YABBY* activities. Plant Cell 22: 2113-2130.

Kerstetter RA, Bollman K, Taylor RA, Bomblies K, Poethig RS (2001) *KANADI* regulates organ polarity in *Arabidopsis*. Nature 411: 706-709.

Eshed Y, Baum SF, Perea JV, Bowman JL (2001) Establishment of polarity in lateral organs of plants. Curr Biol 11: 1251-1260.

Eshed Y, Izhaki A, Baum SF, Floyd SK, Bowman JL (2004) Asymmetric leaf development and blade expansion in *Arabidopsis* are mediated by *KANADI* and *YABBY* activities. Development 131: 2997-3006.

Pekker I, Alvarez JP, Eshed Y (2005) Auxin response factors mediate *Arabidopsis* organ asymmetry via modulation of *KANADI* activity. Plant Cell 17: 2899–2910.

Fahlgren N, Montgomery TA, Howell MD, Allen E, Dvorak SK, et al. (2006) Regulation of *AUXIN RESPONSE FACTOR3* by *TAS3* ta-siRNA affects developmental timing and patterning in *Arabidopsis*. Curr Biol 16:939-944.

Hunter C, Willmann MR, Wu G, Yoshikawa M, de la Luz Gutiérrez-Nava

M, et al. (2006) Trans-acting siRNA-mediated repression of ETTIN and ARF4 regulates heteroblasty in *Arabidopsis*. *Development* 133: 2973-2981.

Kelley DR, Arreola A, Gallagher TL, Gasser CS (2012) ETTIN (ARF3) physically interacts with KANADI proteins to form a functional complex essential for integument development and polarity determination in *Arabidopsis*. *Development* 139: 1105-1109.

Kidner CA, Martienssen RA (2004) Spatially restricted microRNA directs leaf polarity through ARGONAUTE1. *Nature* 428: 81-84.

Garcia D, Collier SA, Byrne ME, Martienssen RA (2006) Specification of leaf polarity in *Arabidopsis* via the *trans*-acting siRNA pathway. *Curr Biol* 16: 933-938.

Chitwood DH, Nogueira FT, Howell MD, Montgomery TA, Carrington JC, et al. (2009) Pattern formation via small RNA mobility. *Genes Dev* 23: 549-554.

Waites R, Hudson A (1995) *phantastica*: a gene required for dorsoventrality of leaves in *Antirrhinum majus*. *Development* 121: 2143-2154.

Byrne ME (2012) Making leaves. *Curr Opin Plant Biol.* 15: 24-30.

Wu G, Lin WC, Huang T, Poethig RS, Springer PS, et al. (2008) KANADI1 regulates adaxial-abaxial polarity in *Arabidopsis* by directly repressing the transcription of *ASYMMETRIC LEAVES2*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 105: 16392-1697.

La Rota C, Chopard J, Das P, Paindavoine S, Rozier F, Farcot E, et al. (2011) A data-driven integrative model of sepal primordium polarity in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 23: 4318-4333.

Iwakawa H, Iwasaki M, Kojima S, Ueno Y, Soma T, et al. (2007) Expression of the *ASYMMETRIC LEAVES2* gene in the adaxial domain of *Arabidopsis* leaves represses cell proliferation in this domain and is critical for the development of properly expanded leaves. *Plant J* 51: 173-184.

Becam I, Rafel N, Hong X, Cohen SM, Milán M (2011) Notch-mediated repression of bantam miRNA contributes to boundary formation in the *Drosophila* wing. *Development* 138: 3781-3789.

Aliee M, Röper JC, Landsberg KP, Pentzold C, Widmann TJ, et al. (2012)

Physical mechanisms shaping the *Drosophila* dorsoventral compartment boundary. *Curr Biol* 22: 967-976.

Reinhardt D, Frenz M, Mandel T, Kuhlemeier C (2005) Microsurgical and laser ablation analysis of leaf positioning and dorsoventral patterning in tomato. *Development* 132: 15-26.

Toyokura K, Watanabe K, Oiwa A, Kusano M, Tameshige T, et al. (2011) Succinic semialdehyde dehydrogenase is involved in the robust patterning of *Arabidopsis* leaves along the adaxial-abaxial axis. *Plant Cell Physiol* 52: 1340-1353.

Carlsbecker A, Lee JY, Roberts CJ, Dettmer J, Lehesranta S, et al. (2010) Cell signalling by microRNA165/6 directs gene dose-dependent root cell fate. *Nature* 465: 316-321.

Miyashima S, Koi S, Hashimoto T, Nakajima K (2011) Non-cell-autonomous microRNA165 acts in a dose-dependent manner to regulate multiple differentiation status in the *Arabidopsis* root. *Development* 138: 2303-2313.

Ilegems M, Douet V, Meylan-Bettex M, Uyttewaal M, Brand L, et al. (2010) Interplay of auxin, KANADI and Class III HD-ZIP transcription factors in vascular tissue formation. *Development* 137: 975-984.

Dello Ioio R, Galinha C, Fletcher AG, Grigg SP, Molnar A, et al. (2012) A PHABULOSA/cytokinin feedback loop controls root growth in *Arabidopsis*. *Curr Biol* 22: 1699-1704.

Gillmor CS, Park MY, Smith MR, Pepitone R, Kerstetter RA, et al. (2010) The MED12-MED13 module of Mediator regulates the timing of embryo patterning in *Arabidopsis*. *Development* 137: 113-122.

Heisler MG, Ohno C, Das P, Sieber P, Reddy GV, et al. (2005) Patterns of auxin transport and gene expression during primordium development revealed by live imaging of the *Arabidopsis* inflorescence meristem. *Curr Biol* 15: 1899-1911.

Golz JF, Roccaro M, Kuzoff R, Hudson A (2004) *GRAMINIFOLIA* promotes growth and polarity of *Antirrhinum* leaves. *Development* 131: 3661-3670.

Yamada T, Yokota S, Hirayama Y, Imaichi R, Kato M, et al. (2011)

Ancestral expression patterns and evolutionary diversification of YABBY genes in angiosperms. *Plant J* 67: 26-36.

Nakata M, Matsumoto N, Tsugeki R, Rikirsch E, Laux T, et al. (2012) Roles of the middle domain-specific *WUSCHEL-RELATED HOMEODOMAIN* genes in early development of leaves in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 24: 519-535.

Watanabe K, Okada K (2003) Two discrete cis elements control the Abaxial side-specific expression of the *FILAMENTOUS FLOWER* gene in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 15: 2592-2602.

Woodson JD, Chory J (2008) Coordination of gene expression between organellar and nuclear genomes. *Nat Rev Genet* 9: 383-395.

Pogson BJ, Woo NS, Förster B, Small ID (2008) Plastid signalling to the nucleus and beyond. *Trends Plant Sci* 13: 602-609.

Larkin RM, Ruckle ME (2008) Integration of light and plastid signals. *Curr Opin Plant Biol* 11: 593-599.

Pfannschmidt T (2010) Plastidial retrograde signalling--a true "plastid factor" or just metabolite signatures? *Trends Plant Sci* 15: 427-435.

Inaba T, Yazu F, Ito-Inaba Y, Kakizaki T, Nakayama K (2011) Retrograde signaling pathway from plastid to nucleus. *Int Rev Cell Mol Biol* 290: 167-204.

Otsuga D, DeGuzman B, Prigge MJ, Drews GN, Clark SE (2001) *REVOLUTA* regulates meristem initiation at lateral positions. *Plant J* 25: 223-236.

渡辺 恵郎 (2003) 「シロイヌナズナを用いた向背軸形成機構の分子遺伝学的解析」平成 15 年度 博士論文

爲重 才覚 (2009) 「シロイヌナズナ突然変異体 *enlarged fil expression domain2* を用いた向背軸形成機構の解析」平成 20 年度 修士論文

Anastasiou E, Kenz S, Gerstung M, MacLean D, Timmer J, et al. (2007) Control of plant organ size by KLUH/CYP78A5-dependent intercellular signaling. *Dev Cell* 13: 843-856.

Zhou GK, Kubo M, Zhong R, Demura T, Ye ZH (2007) Overexpression of miR165 affects apical meristem formation, organ polarity establishment and vascular development in *Arabidopsis*. *Plant Cell Physiol* 48: 391-404.

Liu Z, Jia L, Wang H, He Y (2011) HYL1 regulates the balance between

adaxial and abaxial identity for leaf flattening via miRNA-mediated pathways. *J Exp Bot* 62: 4367-4381.

Grainger RJ, Beggs JD (2005) Prp8 protein: at the heart of the spliceosome. *RNA* 11: 533-557.

Schwartz BW, Yeung EC, Meinke DW (1994) Disruption of morphogenesis and transformation of the suspensor in abnormal *suspensor* mutants of *Arabidopsis*. *Development* 120: 3235-3245.

Mulo P, Pursiheimo S, Hou C, Tyystjärvi T, Aro E (2003) Multiple effects of antibiotics on chloroplast and nuclear gene expression. *Funct Plant Biol*. 2003, 30, 1097–1103.

Breitenbach J, Zhu C, Sandmann G (2001) Bleaching herbicide norflurazon inhibits phytoene desaturase by competition with the cofactors. *J Agric Food Chem* 49: 5270-5272.

Oelmüller R (1989) Photooxidative destruction of chloroplasts and its effect on nuclear gene expression and extraplastidic enzyme levels. *Photochem Photobiol* 49: 229-239.

Bersoult A, Chateigner-Boutin AL, Hammani K, Yap A, Delannoy E, et al. (2009) Roles for RNA editing factors in leaf development. 20th International Conference on Arabidopsis Research: C03

Serrano-Cartagena J, Robles P, Ponce MR, Micol JL (1999) Genetic analysis of leaf form mutants from the *Arabidopsis* Information Service collection. *Mol Gen Genet* 261: 725-739.

Ankele E, Kindgren P, Pesquet E, Strand A. (2007) In vivo visualization of Mg-protoporphyrin IX, a coordinator of photosynthetic gene expression in the nucleus and the chloroplast. *Plant Cell*. 19: 1964-1979.

Woodson JD, Perez-Ruiz JM, Schmitz RJ, Ecker JR, Chory J. (2013) Sigma factor-mediated plastid retrograde signals control nuclear gene expression. *Plant J* 73: 1–13.

Koussevitzky S, Nott A, Mockler TC, Hong F, Sachetto-Martins G, et al. (2007) Signals from chloroplasts converge to regulate nuclear gene expression. *Science* 316: 715-719.

Cottage AJ, Mott EK, Wang JH, Sullivan JA, MacLean D, et al. (2008) *GUN1 (GENOMES UNCOUPLED1)* encodes a pentatricopeptide repeat

(PPR) protein involved in plastid protein synthesis-responsive retrograde signaling to the nucleus. In: Allen JF, Gantt E, Golbeck JH, Osmond B, editors. Photosynthesis. Energy from the Sun; 14th International Congress on Photosynthesis; Springer-Verlag, Berlin. pp. 1205–1211.

Mochizuki N, Brusslan JA, Larkin R, Nagatani A, Chory J (2001) *Arabidopsis genomes uncoupled 5 (GUN5)* mutant reveals the involvement of Mg-chelatase H subunit in plastid-to-nucleus signal transduction. Proc Natl Acad Sci U S A 98: 2053-2058.

Sussex IM (1954) Experiments on the cause of dorsiventrality in leaves. Nature 174: 351-352.

Snow M, Snow R (1959) The dorsiventrality of leaf primordia. New Phytol 58: 188–207

Hanawa J (1961) Experimental studies of leaf dorsiventrality in *Sesamum indicum*. L. Bot. Mag. Tokyo 74: 303–309

Wang W, Xu B, Wang H, Li J, Huang H, et al. (2011) *YUCCA* genes are expressed in response to leaf adaxial-abaxial juxtaposition and are required for leaf margin development. Plant Physiol 157: 1805-1819.

Igarashi K, Kashiwagi K (1999) Polyamine transport in bacteria and yeast. Biochem J 344:633-42.

Ferro M, Brugière S, Salvi D, Seigneurin-Berny D, Court M, et al. (2010) AT_CHLORO, a comprehensive chloroplast proteome database with subplastidial localization and curated information on envelope proteins. Mol Cell Proteomics 9: 1063-1084.

Antognoni F, Del Duca S, Kuraishi A, Kawabe E, Fukuchi-Shimogori T, et al. (1999) Transcriptional inhibition of the operon for the spermidine uptake system by the substrate-binding protein PotD. J Biol Chem 274: 1942-1948.

Majeran W, Friso G, Asakura Y, Qu X, Huang M, et al. (2012) Nucleoid-enriched proteomes in developing plastids and chloroplasts from maize leaves: a new conceptual framework for nucleoid functions. Plant Physiol 158: 156-189.

Chatterjee M, Sparvoli S, Edmunds C, Garosi P, Findlay K, et al. (1996) *DAG*, a gene required for chloroplast differentiation and palisade development in *Antirrhinum majus*. EMBO J 15: 4194-4207.

Keddie JS, Carroll B, Jones JD, Gruissem W (1996) The *DCL* gene of tomato is required for chloroplast development and palisade cell morphogenesis in leaves. *EMBO J* 15: 4208-4217.

Babiychuk E, Fuangthong M, Van Montagu M, Inzé D, Kushnir S (1997) Efficient gene tagging in *Arabidopsis thaliana* using a gene trap approach. *Proc Natl Acad Sci U S A* 94: 12722-12727.

Hricová A, Quesada V, Micol JL (2006) The *SCABRA3* nuclear gene encodes the plastid RpoTp RNA polymerase, which is required for chloroplast biogenesis and mesophyll cell proliferation in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 141: 942-956.

Babiychuk E, Vandepoele K, Wissing J, Garcia-Diaz M, De Rycke R, et al. (2011) Plastid gene expression and plant development require a plastidic protein of the mitochondrial transcription termination factor family. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: 6674-6679.

Fleischmann TT, Scharff LB, Alkatib S, Hasdorf S, Schöttler MA, et al. (2011) Nonessential plastid-encoded ribosomal proteins in tobacco: a developmental role for plastid translation and implications for reductive genome evolution. *Plant Cell* 23: 3137-3155.

Moschopoulos A, Derbyshire P, Byrne ME (2012) The *Arabidopsis* organelle-localized glycyl-tRNA synthetase encoded by *EMBRYO DEFECTIVE DEVELOPMENT1* is required for organ patterning. *J Exp Bot* 63: 5233-5243.

Lee KH, Park J, Williams DS, Xiong Y, Hwang I, et al. (2012) Defective chloroplast development inhibits maintenance of normal levels of abscisic acid in a mutant of the *Arabidopsis RH3* DEAD-box protein during early post-germination growth. *Plant J* 73: 720-732

Kode V, Mudd EA, Iamtham S, Day A. (2005) The tobacco plastid *accD* gene is essential and is required for leaf development. *Plant J* 44: 237-244.

Ruckle ME, Burgoon LD, Lawrence LA, Sinkler CA, Larkin RM, et al. (2012) Plastids are major regulators of light signaling in *Arabidopsis*. *Plant Physiol* 159: 366-390.

Kakizaki T, Matsumura H, Nakayama K, Che FS, Terauchi R, et al. (2009) Coordination of plastid protein import and nuclear gene expression by

plastid-to-nucleus retrograde signaling. *Plant Physiol* 151: 1339-1353.

Sun X, Feng P, Xu X, Guo H, Ma J, et al. (2011) A chloroplast envelope-bound PHD transcription factor mediates chloroplast signals to the nucleus. *Nat Commun* 2: 477.

Brandt R, Xie Y, Musielak T, Graeff M, Stierhof YD, et al. (2013) Control of stem cell homeostasis via interlocking microRNA and microProtein feedback loops. *Mech Dev* 130: 25-33.

Ruckle ME, DeMarco SM, Larkin RM. (2007) Plastid signals remodel light signaling networks and are essential for efficient chloroplast biogenesis in *Arabidopsis*. *Plant Cell* 19: 3944-3960.

Bonaccorso O, Lee JE, Puah L, Scutt CP, Golz JF. (2012) *FILAMENTOUS FLOWER* controls lateral organ development by acting as both an activator and a repressor. *BMC Plant Biol* 12: 176

Murray JD (2003) *Mathematical Biology II: Spatial Models and Biomedical Applications*. 3rd Ed. New York: Springer-Verlag New York. pp. 1-70.

Jaeger J, Surkova S, Blagov M, Janssens H, Kosman D, et al. (2004) Dynamic control of positional information in the early *Drosophila* embryo. *Nature* 430: 368-371.

Jilkine A, Marée AF, Edelstein-Keshet L. (2007) Mathematical model for spatial segregation of the Rho-family GTPases based on inhibitory crosstalk. *Bull Math Biol* 69: 1943-1978.

Burch-Smith TM, Brunkard JO, Choi YG, Zambryski PC (2011) Organelle-nucleus cross-talk regulates plant intercellular communication via plasmodesmata. *Proc Natl Acad Sci U S A* 108: E1451-E1460.

Kojima S, Iwasaki M, Takahashi H, Imai T, Matsumura Y, et al. (2011) Asymmetric leaves2 and Elongator, a histone acetyltransferase complex, mediate the establishment of polarity in leaves of *Arabidopsis thaliana*. *Plant Cell Physiol* 52: 1259-1273.

Sanders H, Rothwell GW, Wyatt S (2007) Paleontological context for the developmental mechanisms of evolution. *Int J Plant Sci* 168: 719-728.

Floyd SK and Bowman JL (2007) The ancestral developmental tool kit of land plants. *Int J Plant Sci* 168: 1–35.

謝辞

本研究を進めるにあたって私が学部生の頃からずっと指導教員、あるいは委託先指導教員として面倒を見て下さったのは岡田清孝先生（前 基礎生物学研究 所（基生研）所長）です。いつも暖かく、また厳しく指導していただき、ご多忙の中にあっても、私の研究や論文執筆に粘り強く付き合ってくださいました。大変感謝しています。鹿内利治教授（京都大学理学研究科）には基生研で研究したいという私の我が儘を許して下さった一方、私が研究のこと、生活や将来のことなどを相談するたびに親身になって相談に乗って下さいました。また本研究を進展させる上で重要だった、私と Ian Small 教授との仲を取り持ってもらってスムーズに研究できるよう取りはからって頂きました。ありがとうございました。

植物分子遺伝学分科の皆様、そして基礎生物研究所の皆様にはいつもお世話になりました。特に槻木竜二先生（京都大学）には研究や論文執筆の相談に、いつも全精力を傾けて私の指導にあたってくださいました。槻木先生の指導がなければ、私の研究はもっと詰めの甘いものになっていたはずだと今さら不安を感じています。ありがとうございました。故、松本任孝先生（京都大学）との別れは私が学部生のときでしたが、研究室内できちんと人間関係を構築して、自分と研究室の仕事を良いリズムで進めることの大切さを教えて頂きました。ありがとうございました。基生研の研究室で日頃から指導してくださったのは立松圭先生（基生研）です。立松先生はご多忙の中でも、いつも暖かい心でディスカッションに付き合ってください、より良い研究の方向性を一緒に探して下さいました。ありがとうございました。

長谷あきら教授（京都大学）は私が基生研で研究する機会を与えてくださいました。ありがとうございました。望月伸悦先生（京都大学）には変異体 *gun1*, *gun5* の種子を分けて頂き、また何度も私の研究の相談に喜んで乗って頂きお世話になりました。Ian Small 教授（西オーストラリア大学）には変異体 *flv* を分けて頂きました。John Bowman 教授（モナシュ大学）には *phb-1d*, *rev-6* 変異体を使わせて頂き、また研究のディスカッションにも付き合ってくださいました。Michael Lenhard 教授（ポツダム大学）には CRE loxP システムに関わるベクターを一式分けて頂きました。*sus2-4*, *-5* の種子は Syngenta 社（米国）から配布されているものを使わせて頂きました。ベクター pGWB-NB1 は中川強教授（島根大学）から頂いたものです。

西村幹夫教授（基生研）と近藤真紀さん（基生研）には透過型顕微鏡観察で

ご協力いただきました。金井雅武博士（基生研）からは定量的 RT-PCR のプライマーを一部分けて頂きました。川口正代司教授（基生研）、藤田浩徳博士（基生研）は数理モデルの構築とシミュレーションについて、素人である私に非常に丁寧に教えて下さいました。重信秀治博士（基生研）、山口勝司博士（基生研）はじめ生物機能情報分析室の方には次世代シーケンサー SOLiD を用いた解析でお世話になりました。椎名隆教授（京都府立大学）、八木祐介博士（九州大学）は私がプラスチド遺伝子発現の解析に取り組み始めた頃、試行錯誤や実験計画の改善においてお世話になり、本論文では表立って見えにくい部分ながら大きく貢献してく下さいました。

渡辺恵郎博士（現 地球環境産業技術研究機構）は *enf2* を単離し、解析を私に託してく下さいました。また本研究の基盤となる観察手法、共焦点顕微鏡を用いた茎頂部の観察は渡辺博士が確立してく下さったもので、あらゆる面で本研究は渡辺博士の功績の上に初めて成り立つものです。豊倉浩一博士（神戸大学）、中田未友希博士（立教大学）には基生研の研究室で日々実り多いディスカッションやアドバイスを頂きました。また研究とは失敗や障害の連続であり、時に心身ともに疲れきってしまうこともよくあるものですが、そんなときでもお二人には時に優しく、時に厳しく研究室での生活を支えて頂きました。大変感謝しています。また、池内桃子博士（理化学研究所）には茎頂の観察手法や機器の使用法をよく教えてもらいました。ありがとうございます。杉本渚さん（藤田保健衛生大学）には定量的 PCR の実験を手伝っていただきました。松本美和子さん（基生研）には培地作製や植物の世話で日々お世話になりました。都築夕美子さんには種子の収穫などを手伝って頂きました。豊倉（中森）ちひろさん（神戸大学）には顕微鏡像の扱いなど勉強させて頂きました。坂神真理さんには基生研での事務手続きをこなして頂き、日常の研究活動や出張の手配などの面から研究を支えて頂きました。奥田賢治博士（中央大学）、上田実博士（京都大学）、高見常明博士（岡山大学）にはプラスチド研究の勉強が足りない私に折に触れてアドバイスを下さいました。高木麻友子さん（京都大学）には、基生研での研究を円滑に行うための事務手続きにおいて日々お世話になり、とても感謝しています。

他にもここに書ききれませんが、京都大学鹿内研究室の皆さん、基生研の前岡田所長研究室の皆さんには、研究を進める上で日頃の議論とアドバイスにおいて、大変お世話になりました。また、近隣の研究室のスタッフの先生方、

先輩方、同級生達にも折に触れて様々なアドバイス、励ましの言葉を頂き、博士後期課程の研究生活を乗り切る上で大きな力になったと感じています。

最後になりましたが、博士後期課程に進んで研究に没頭できたのは、何をおいてもまず両親の理解と支えがあったからです。本当にありがとうございました。

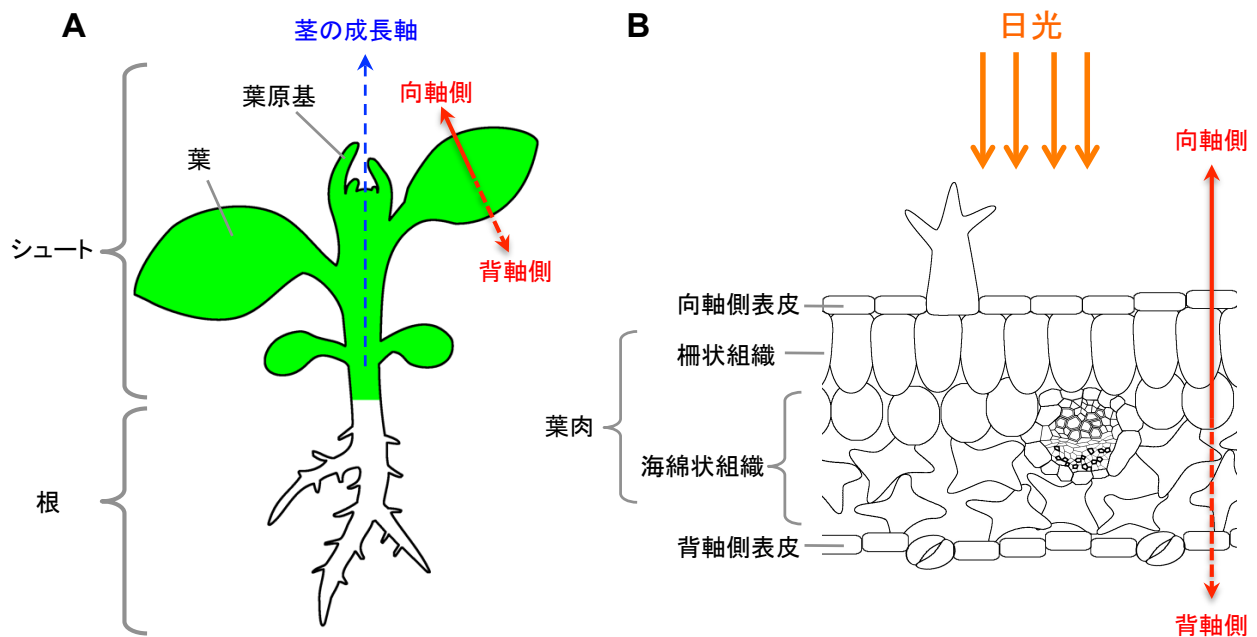


図1 種子植物の向背軸

(A) 種子植物の体制を示す模式図。平面的な葉のうち、茎が成長してゆく上方向の軸（茎の成長軸）に対して、向いている側が向軸側、背いている側が背軸側である。
 (B) シロイヌナズナ本葉断面の模式図。葉肉の向軸側には柵状組織が、背軸側には海綿状組織が形成される。

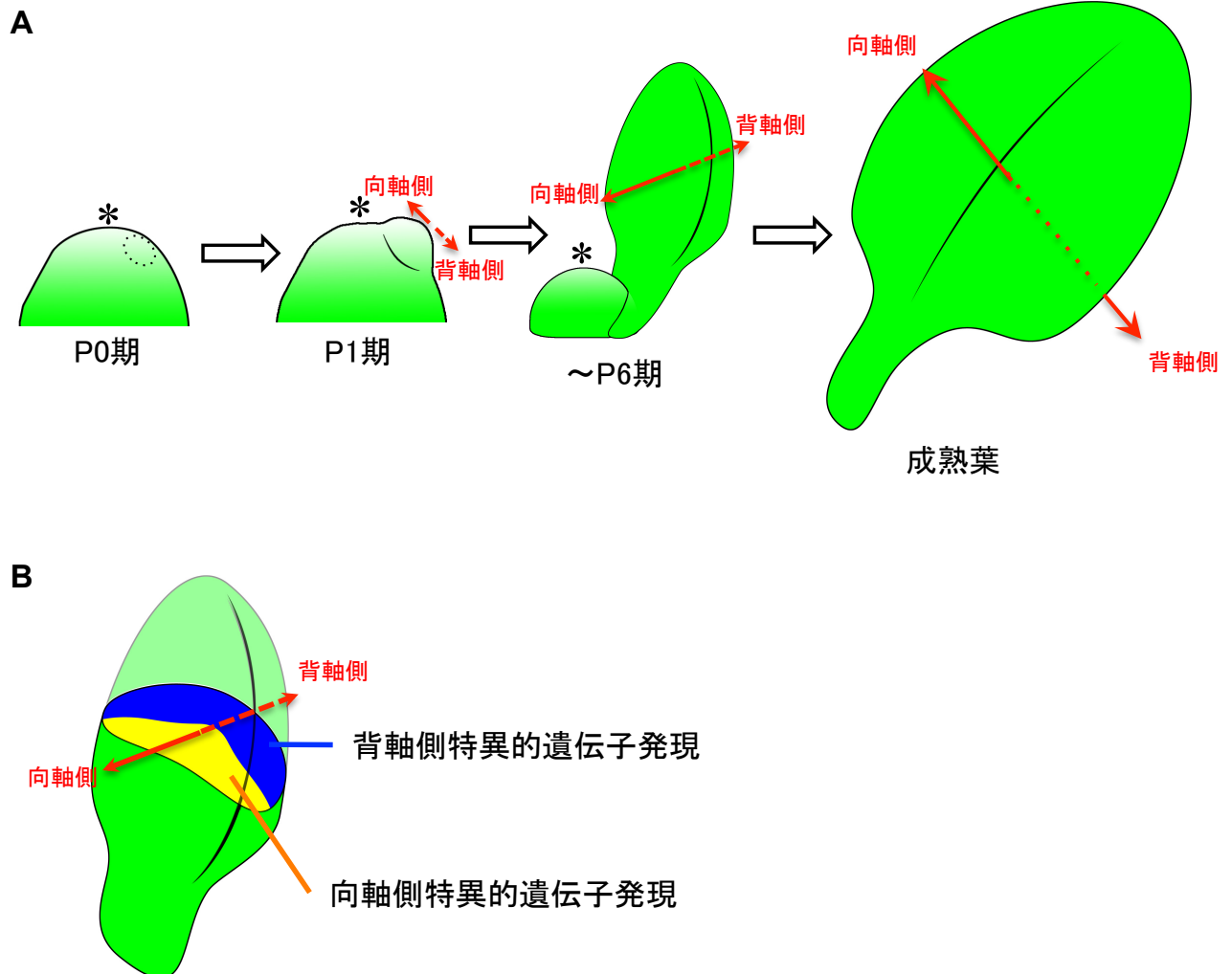


図2 葉の発生過程

(A) 茎頂分裂組織と葉原基の模式図。茎頂分裂組織からの盛り上がりとして見える直前の段階がP0期、盛り上がった直後の葉原基がP1期。シロイヌナズナの場合P6期頃までには、向背軸と直交方向に平面的な形態がはっきりと見え、向軸側と背軸側の細胞分化の違いも見え始める。

(B) 葉原基における向軸側と背軸側の遺伝子発現領域の模式図。葉原基中央付近の横断面を描いている。あくまで概念的な模式図であり、各々の発現領域の面積や形状の点で正確とは限らない。

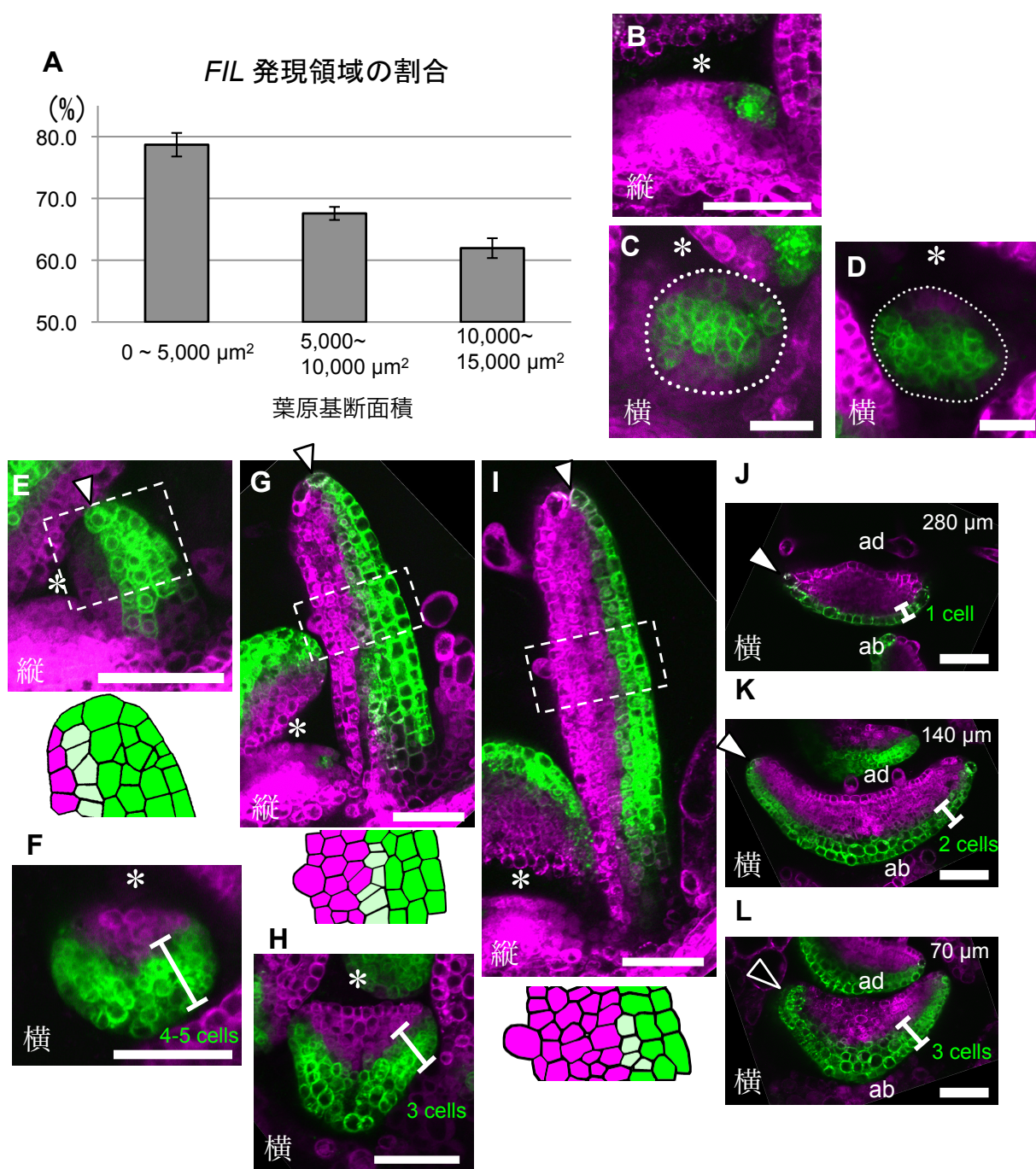


図3 様々な発生段階の葉原基における*FIL*と*PHB*の発現領域

(A) 様々なサイズの葉原基横断面における*FILpro:GFP*の発現領域サイズの割合を縦軸に示している。エラーバー: 平均値標準誤差。標本数はそれぞれ $n > 10$ 。

(B-L) さまざまな発生段階の葉原基における*FIL*と*PHB*の発現領域。緑色は*FIL*の発現マーカー*FILpro:GFP*、マゼンタは*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro:miYFP-W*の蛍光シグナルを表す。「縦」と「横」は縦断面と横断面であることをそれぞれ表す。

E, G, Iの下にそれぞれ点線部の模式図を示してある。J, K, Lの右上に観察面の葉原基基部からの高さを示してある。

*: 茎頂分裂組織の真上、矢じり: 周縁細胞(白)または周縁細胞になると思われる細胞(黒)、ad: 向軸側、ab: 背軸側、スケールバー: 50 μm (B, E-L), 20 μm (C, D)。

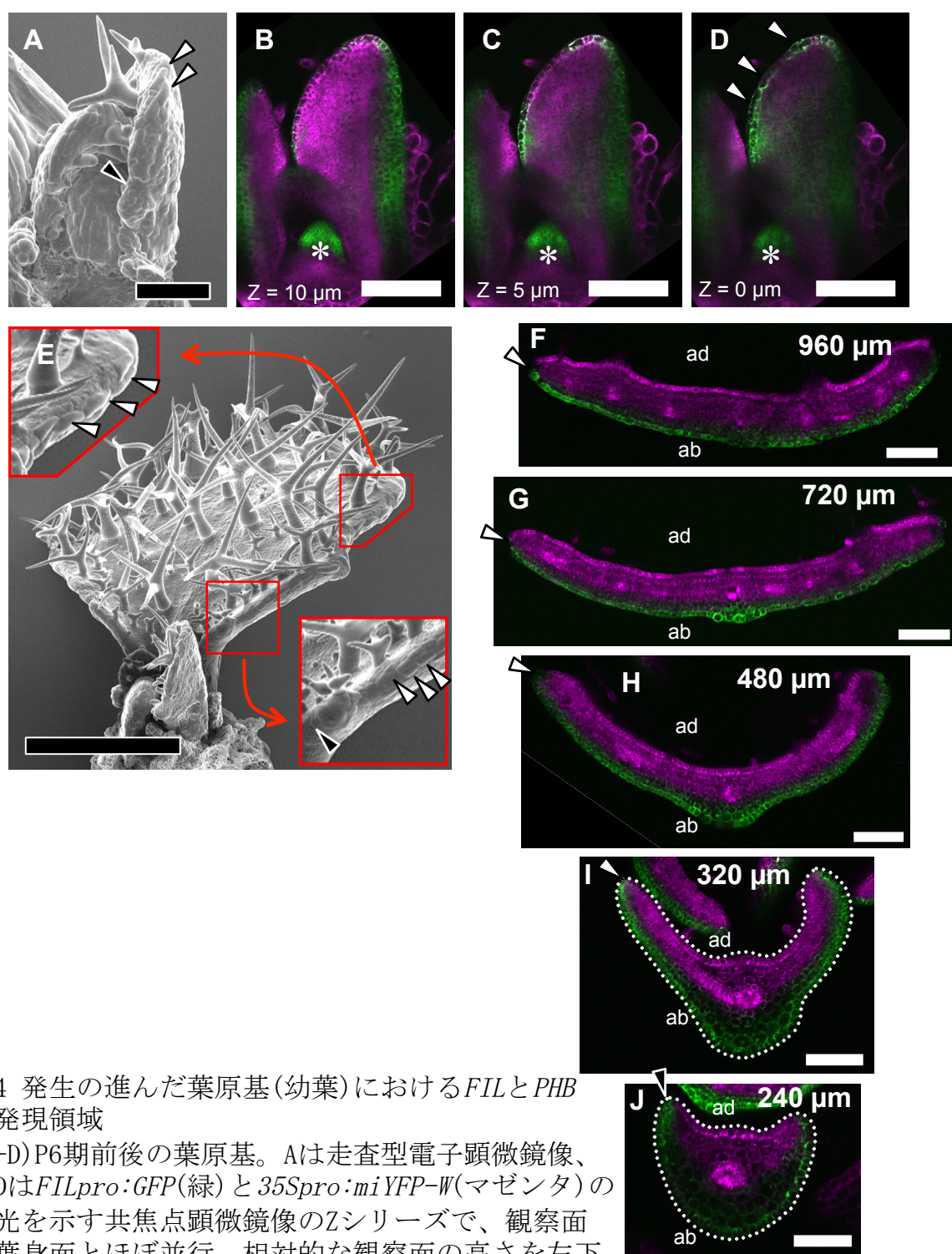


図4 発生の進んだ葉原基(幼葉)における*FIL*と*PHB*の発現領域

(A-D) P6期前後の葉原基。Aは走査型電子顕微鏡像、B-Dは*FILpro::GFP*(緑)と*35Spro::miYFP-W*(マゼンタ)の蛍光を示す共焦点顕微鏡像のZシリーズで、観察面は葉身面とほぼ並行。相対的な観察面の高さを左下に示してある。矢じり：伸長している周縁細胞(白)と、まだ伸長していない周縁細胞と見られる細胞(黒)。*：茎頂分裂組織の真上。

(E-J) P9期前後の葉原基。Eは走査型電子顕微鏡像、F-Jは*FIL*の発現マーカー*FILpro::GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro::miYFP-W*(マゼンタ)の蛍光を示す共焦点顕微鏡像。同一の葉を様々な高さ(上部に表示)の横断面で観察したもの。ad：向軸側、ab：背軸側、スケールバー：100μm(A-D, F-J), 500μm(E)。

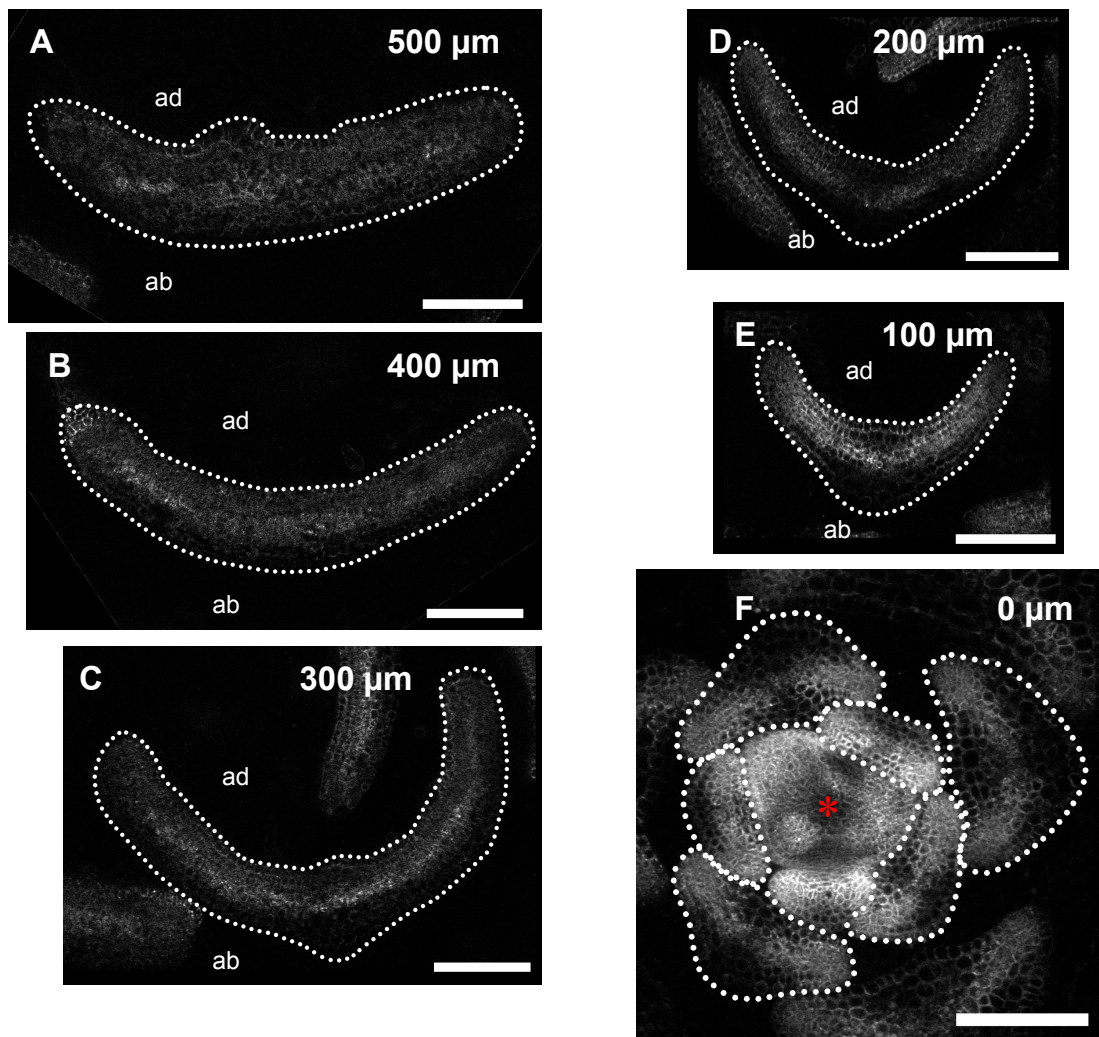


図5 葉原基におけるPHBの転写活性を持つ領域

(A-F) P8期前後の葉原基 (A-E) と茎頂分裂組織や小さい葉原基 (F) における *PHBpro:YFP* (白) の蛍光を示す共焦点顕微鏡像。同一の個体を様々な高さ (上部に表示) の横断面で観察したもの。葉原基の輪郭を点線で示してある。

ad: 向軸側、ab: 背軸側、*: 茎頂分裂組織の真上、スケールバー: 100 μm.

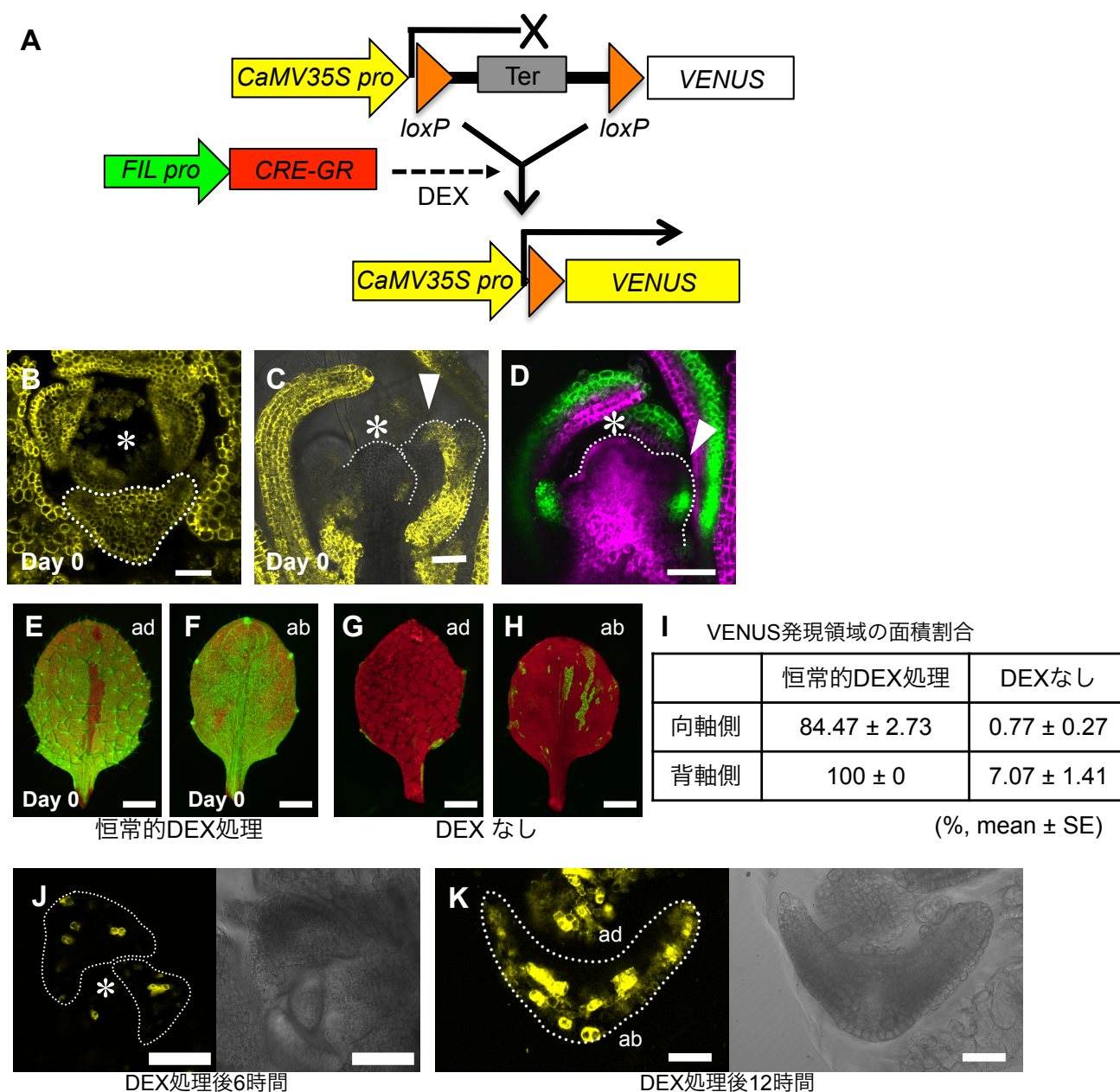


図6 *FIL*発現細胞の系譜を追跡するCRE/loxP組換えシステムの特性

(A) CRE/loxP組換えシステムの模式図

(B, C) 発芽時から恒常的にDEX処理した*FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*形質転換体の茎頂断面におけるVENUS(黄)発現パターンの共焦点顕微鏡像。Bは栄養成長期の茎頂横断面、Cは生殖成長期の縦断面。

(D) 花芽原基における*FIL*の発現マーカー*FILpro:GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro:miYFP-W*(マゼンタ)の蛍光を示す共焦点顕微鏡像。矢じり:花芽原基の中心部分。

(E-I) *FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*形質転換体の3枚目日本葉でのVENUS(黄緑)発現パターン。E-Hは蛍光実体顕微鏡像。E, Fは恒常的にDEX処理したもの、G, HはDEX処理なしのもの。Iは表皮におけるVENUS発現領域の面積を測定した結果(n>8)。

(J) DEX処理なしで育てた*FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*形質転換体をDEX処理した後6時間と12時間におけるVENUS発現パターンを示す共焦点顕微鏡像。DIC像を隣に示す。葉原基の輪郭を点線で示す。

ad: 向軸側、ab: 背軸側、*: 茎頂分裂組織の真上、スケールバー:100μm。

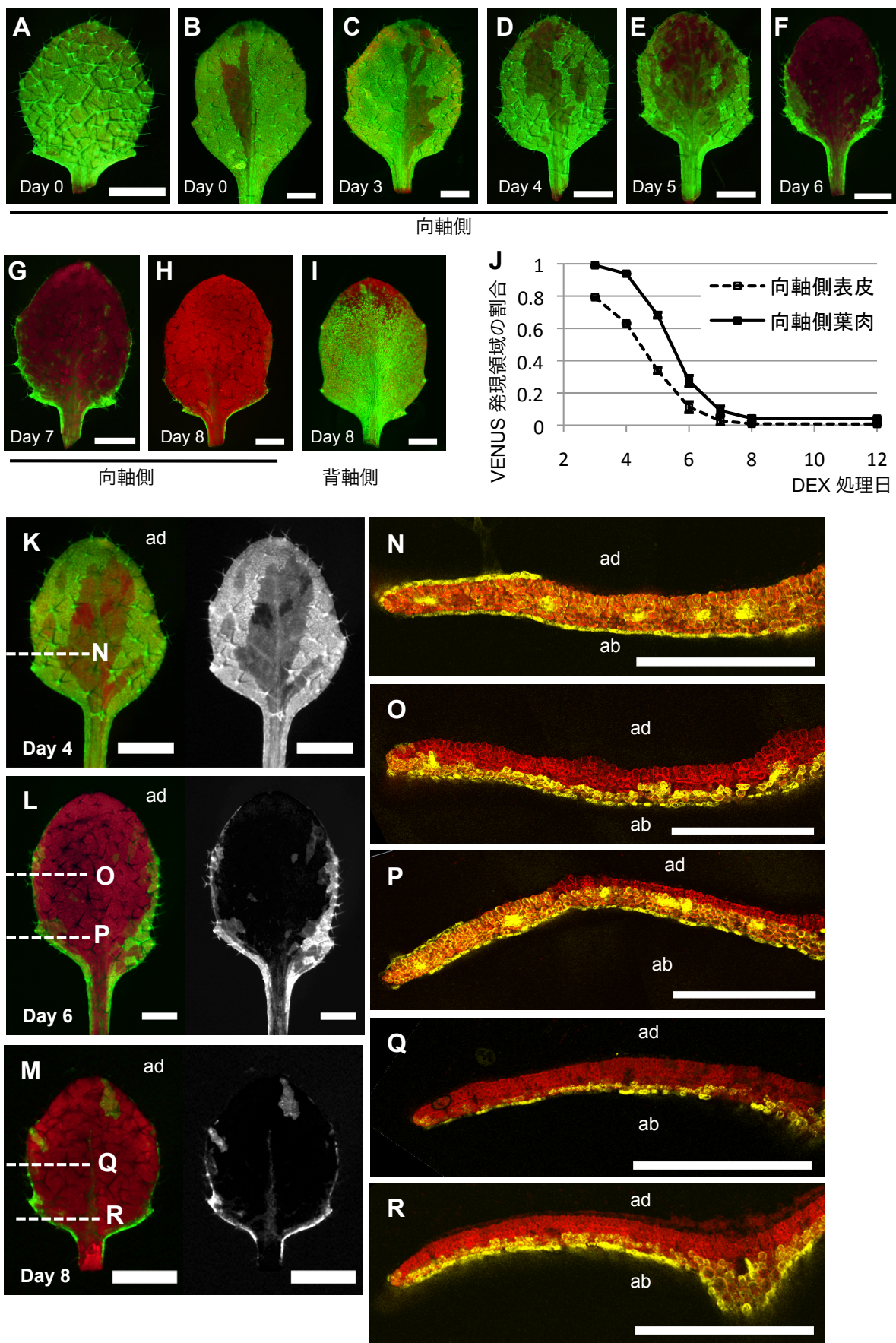


図7 *FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*による*FIL*の発現抑制過程の解析
(A-I, K-M) 3枚目本葉でのVENUS(黄緑)発現パターンを示す蛍光実体顕微鏡像。A-H, K-Mは向軸側から、Iは背軸側から観察したもの。播種後DEX処理を開始した時点を左下に付記してある。K-MについてはRGBカラーデータのうちグリーンチャンネルのみ表示したもの(モノクロ)も右側に表示してある。
(J) A-H, K-Mを含む蛍光実体顕微鏡像からVENUS発現領域の面積を測定した結果。破線は表皮、実線は向軸側葉肉でのVENUS発現領域を示す。エラーバー:平均値標準誤差。標本数はそれぞれ $n > 8$ 。
(N-R) K-Mに破線で示された断面の共焦点顕微鏡像。VENUS蛍光(黄)とクロロフィル蛍光(赤)を示してある。
ad: 向軸側、ab: 背軸側、スケールバー:1mm (A-I, K-M), 500 μ m (N-R).

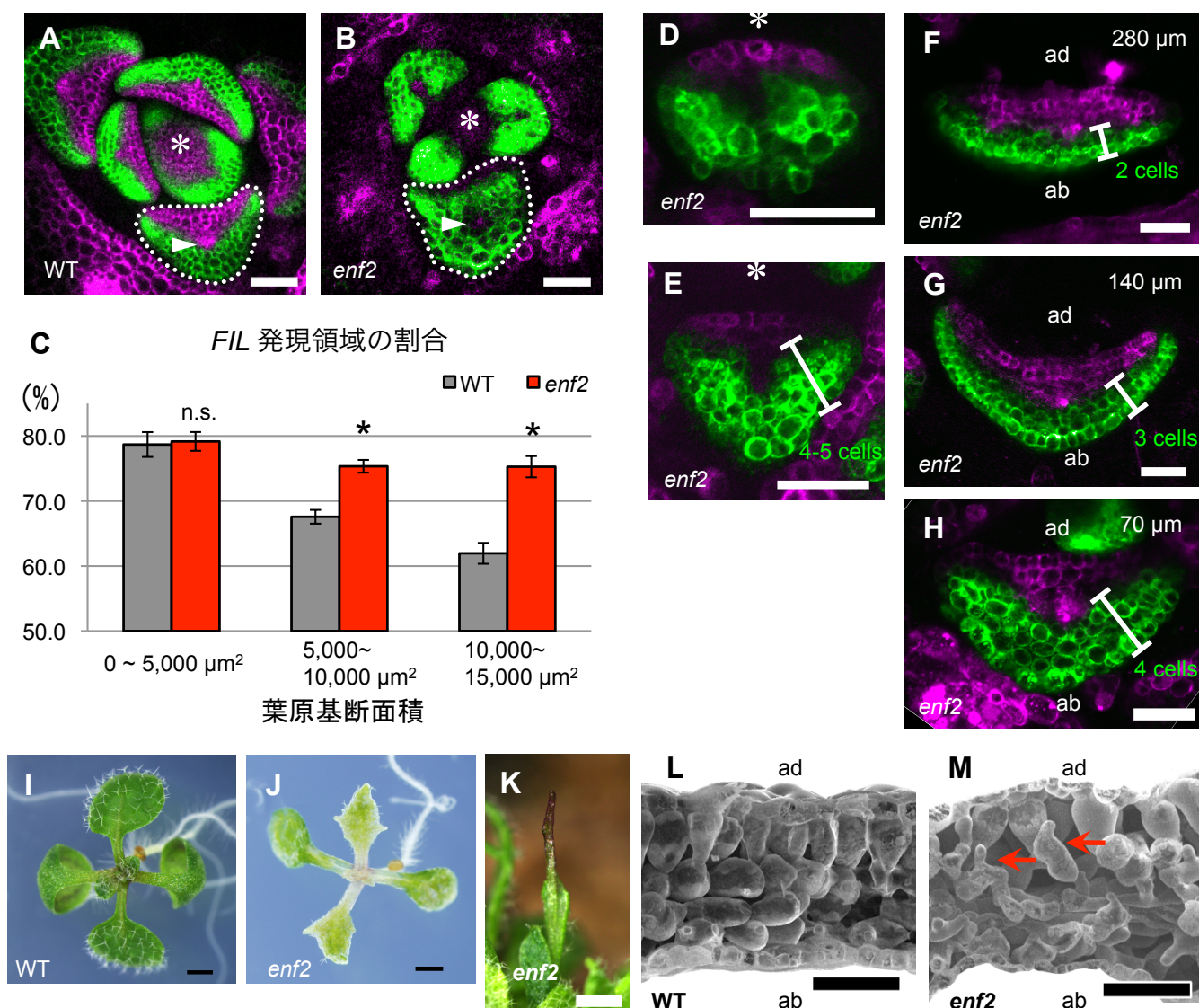


図8 *enf2*における*FIL*と*PHB*の発現領域と形態的表現型

(A, B, D-H) 様々な発生段階の葉原基横断面における*FIL*の発現マーカー*FILpro::GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro::miYFP-W* (マゼンタ)の蛍光パターン。Aは野生型、B, D-Hは*enf2*。F-Hの右上に観察面の葉原基基部からの高さを示してある。矢じり:主脈となる維管束領域。

(C) 様々なサイズの葉原基横断面における*FILpro::GFP*の発現領域サイズの割合。*:野生型と*enf2*で有意差あり、n. s.:野生型と*enf2*で有意差無し。

エラーバー:平均値標準誤差。標本数はそれぞれ $n > 10$ 。

(I, J) 野生型(I)と*enf2*(J)の芽生え。1, 2枚目本葉が画面向かって上下に展開している。

(K) *enf2*における針状の葉。

(L, M) 野生型(L)と*enf2*(M)の本葉断面の走査型電子顕微鏡像。矢印:海綿状組織様の細胞。

*:茎頂分裂組織の真上、ad: 向軸側、ab: 背軸側、スケールバー: 50 μm (A, B, D-H, L, M), 1mm(I, J, K)。

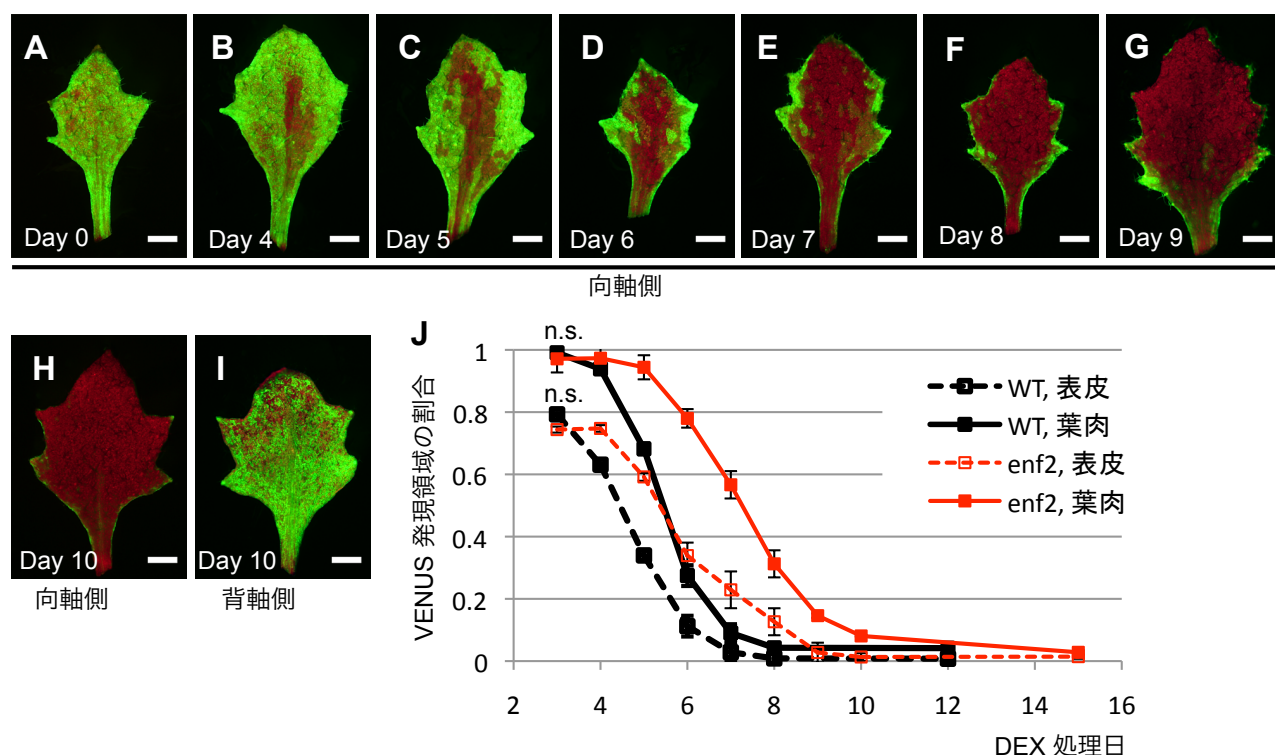


図9 *enf2*における*FIL*の発現抑制過程の解析

(A-I) *enf2 FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*の3枚目本葉でのVENUS(黄緑)発現パターンを示す蛍光実体顕微鏡像。A-Hは向軸側から、Iは背軸側から観察したもの。播種後DEX処理を開始した時点を左下に付記してある。スケールバー: 1mm.

(J) A-Hを含む蛍光実体顕微鏡像からVENUS発現領域の面積を測定した結果。破線は向軸側表皮、実線は向軸側葉肉でのVENUS発現領域を示す。野生型のデータを黒(図7Jと同一)で、*enf2*のデータを赤で示す。n. s.:野生型と*enf2*で有意差無し。

エラーバー: 平均値標準誤差。標本数はそれぞれ $n > 8$ 。

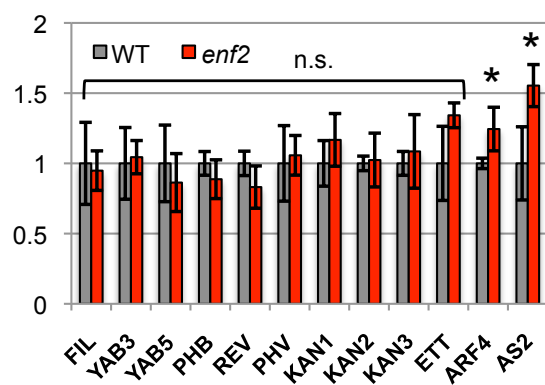


図10 *enf2*における向軸側と背軸側に特異的な転写因子群の茎頂全体での発現レベル
野生型での発現量(灰色)を1としたときの*enf2*での相対的発現量(赤)を示す。標本数はそれぞれn=4。

*:野生型と*enf2*で有意差あり、n. s. :野生型と*enf2*で有意差無し。

エラーバー: 平均値標準誤差。

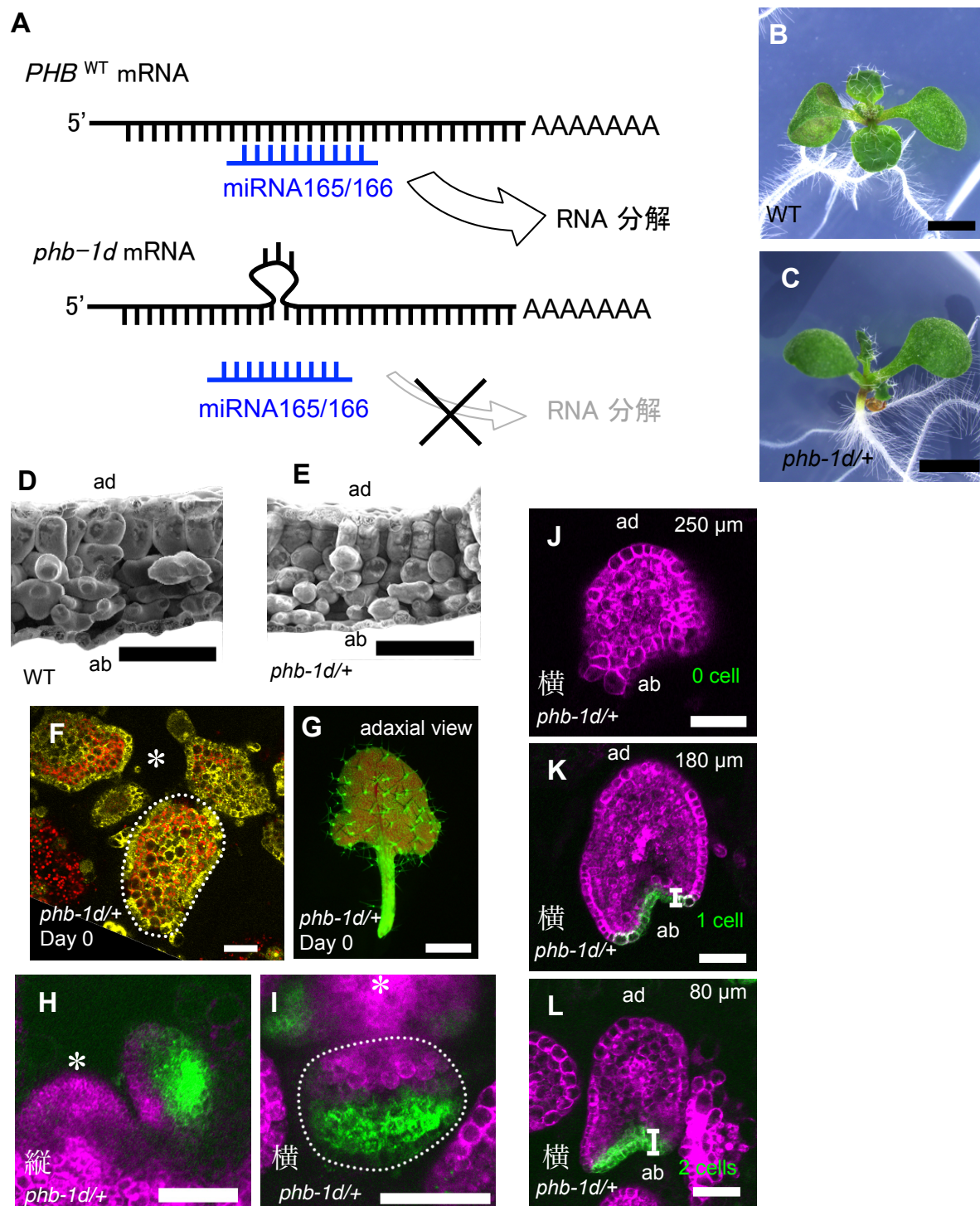


図11 *phb-1d/+*における*FIL*と*PHB*の発現領域

(A) *PHB* mRNAがmiR165/166によって分解される様子の模式図。野生型*PHB*(*PHB^{WT}*)アリルのmRNAはmiR165/166によって分解されるが、*phb-1d*アリルのmRNAはmiR165/166による分解を受けにくい(Mallory et al., 2004)。

(B, C) 野生型と*phb-1d/+*の芽生え。画面向かって上下に1, 2枚目の本葉が展開している。

(D, E) 野生型(B) と*phb-1d/+*(C) の本葉断面の走査型電子顕微鏡像。

(F, G) *phb-1d/+ FILpro:CRE-GR 35Spro:loxP-Ter-loxP-VENUS*のVENUS発現パターン。Fは茎頂横断面の共焦点顕微鏡像、Gは本葉の蛍光実体顕微鏡像。それぞれ播種時から恒常的にDEX処理したもの。

(H-L) *phb-1d/+*の様々な発生段階の葉原基断面における*FIL*の発現マーカー*FILpro:GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro:miYFP-W*(マゼンタ)の蛍光パターン。F-Hの右上に観察面の葉原基基部からの高さを示してある。H, I, J, K, Lのそれぞれの対照となる野生型の結果は図3E, F, J, K, Lである。「縦」と「横」は縦断面と横断面であることをそれぞれ表す。

*: 茎頂分裂組織の真上、ad: 向軸側、ab: 背軸側、
スケールバー: 1mm (B, C, G), 50μm (D, E), 100μm (F, H-L)。

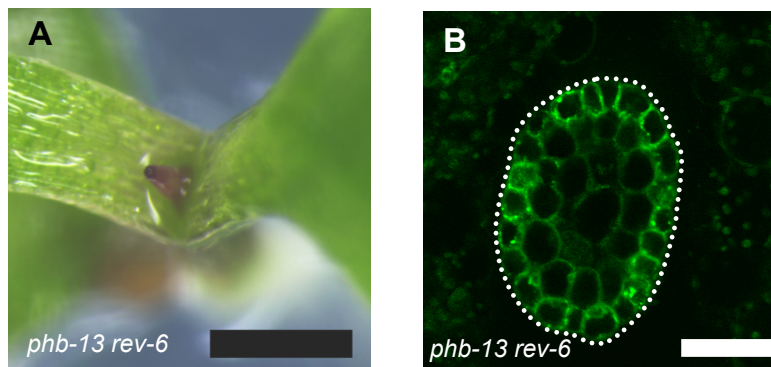


図12 *phb-13 rev-6*二重変異体における*FIL*の発現領域

(A) 芽生え茎頂部。針状の本葉が見える。

(B) 約300 μ m長の葉原基横断面における*FIL*の発現マーカー*FILpro::GFP*(緑)の蛍光パターン。

スケールバー: 500 μ m (A), 50 μ m (B).

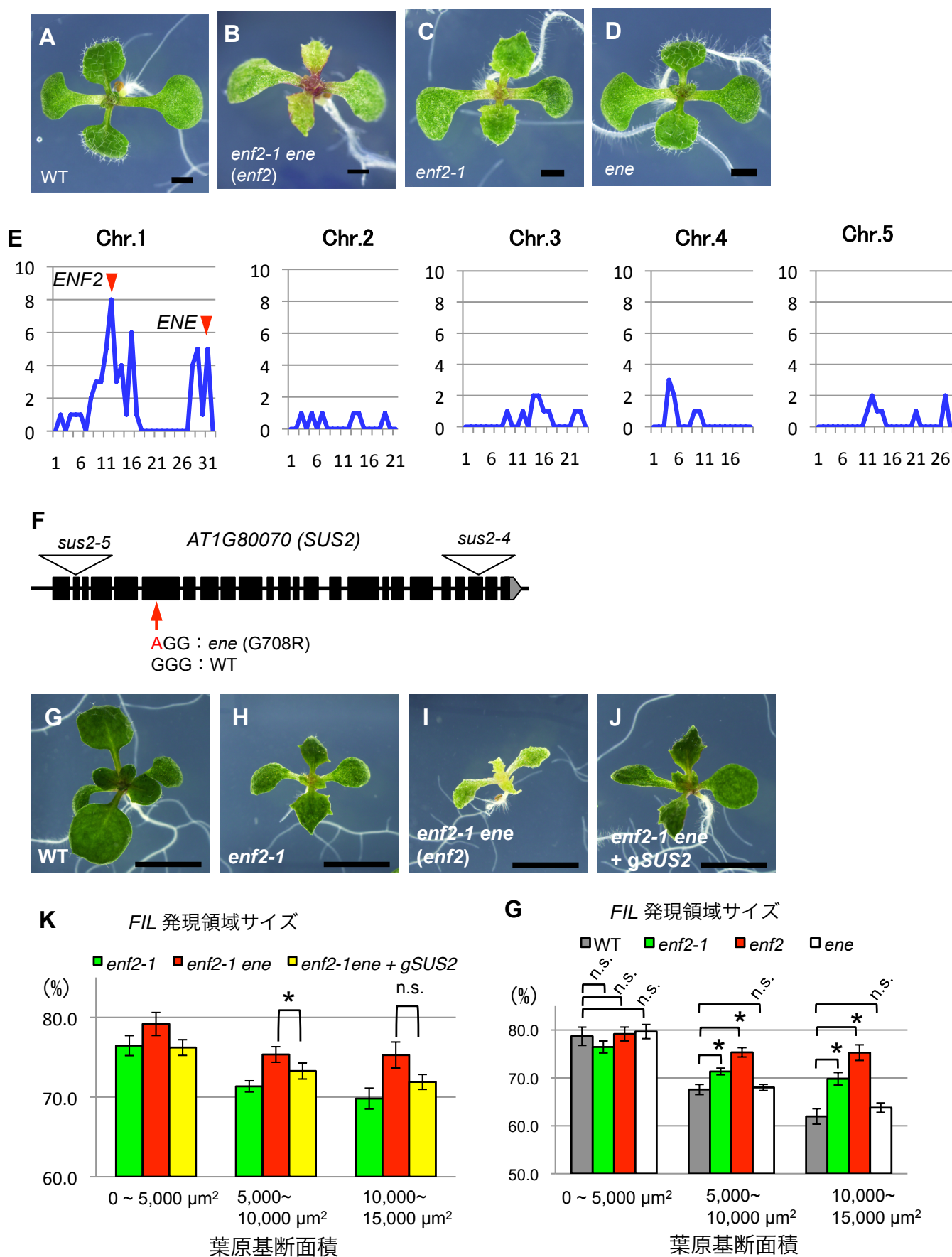


図13 *ene*変異の同定

(A-D) 野生型(A)、*enf2*(B)、*enf2-1*単独変異体(C)、*ene*単独変異体(D)の芽生え。

(E) *enf2*ゲノム中の一塩基置換変異の分布。1番染色体から5番染色体まで、100万塩基対ごとに区切ってホモ変異の数を縦軸にプロットしている。

(F) *AT1G80070/SUS2*の遺伝子の模式図。四角:エキソン、灰色:非翻訳領域。*sus2-4*, -5変異のT-DNA挿入を三角形で、*ene*変異を矢印で示す。

(G-J) 野生型(G)、*enf2-1*単独変異体(H)、*enf2*(I)、*AT1G80070/SUS2*の野生型ゲノム断片(*gSUS2*)を導入した*enf2*(J)の芽生え。A-Dの芽生えと違って、ここでは生育速度の違いを強調するため16℃で生育したものを示している。

(K, G) 様々なサイズの葉原基横断面における*FILpro::GFP*の発現領域サイズの割合。エラーバー: 平均値標準誤差。標本数はいずれもn>10。

*: 有意差あり、n. s.: 有意差無し。

スケールバー: 1mm (A-D), 5mm (G-J)。

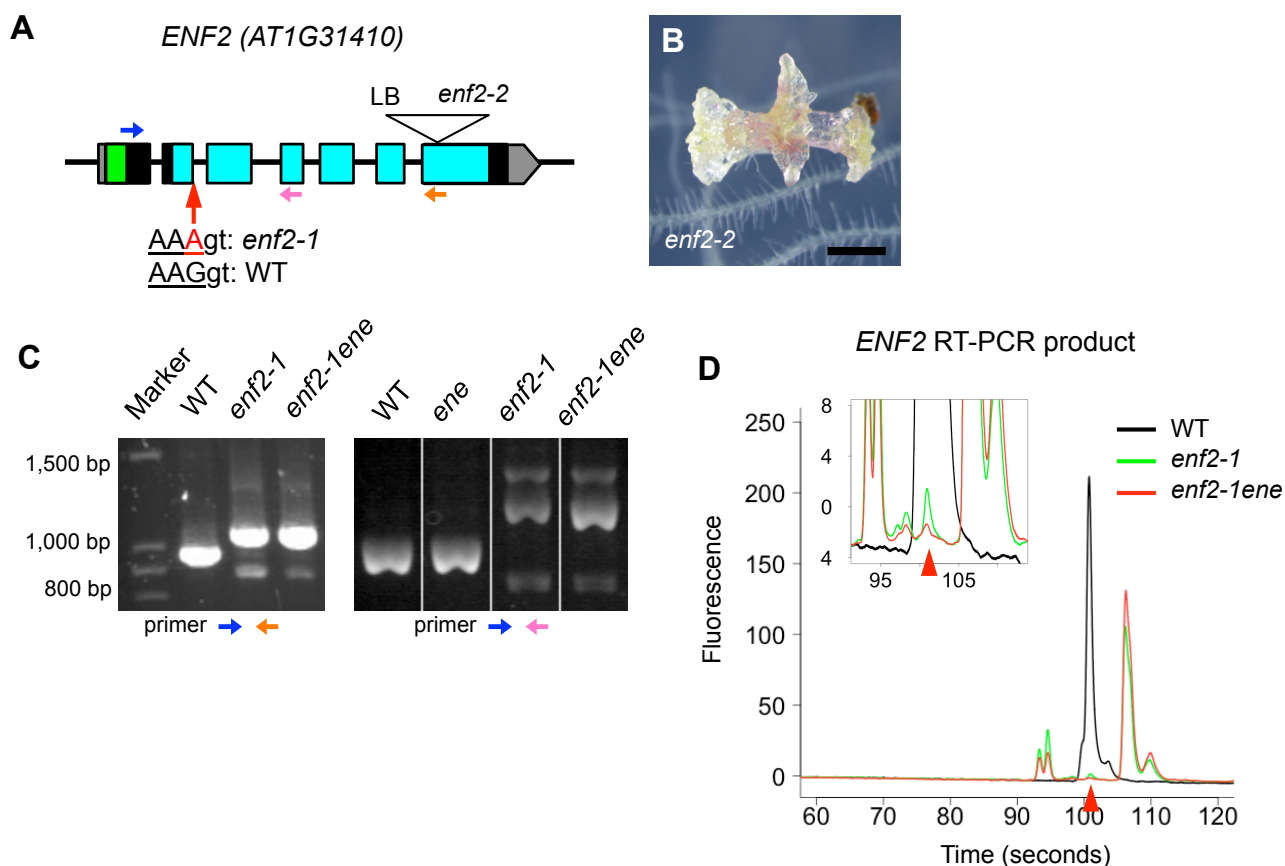


図14 *enf2*変異体における*ENF2*のmRNAスプライシングパターン

(A) *ENF2*遺伝子の模式図。四角:エキソン、灰色:非翻訳領域、緑:推定トランジットペプチド、シアン:バクテリアホモログPotD, PotFとの相同領域。*enf2-2*変異のT-DNA挿入を三角形で、*ene*変異を赤矢印で示す。横向きの矢印(青、ピンク、オレンジ)はC, Dの解析に用いたPCRプライマーに対応する配列部分。

(B) *enf2-2*の芽生え。

(C) *ENF2* mRNAのRT-PCR結果。PCR産物をアガロースゲル電気泳動し、エチジウムブロマイド染色したもの。

(D) C右側のRT-PCR産物のマイクロ流動電気泳動による泳動図。野生型(黒)、*enf2-1*(緑)、*enf2-1ene*(赤)とも、独立3サンプルの泳動結果の平均値をプロットしている。赤矢じりで野生型のmRNAに対応するピーク位置を示す。左上に拡大図を示す。

スケールバー: 1mm(B)。

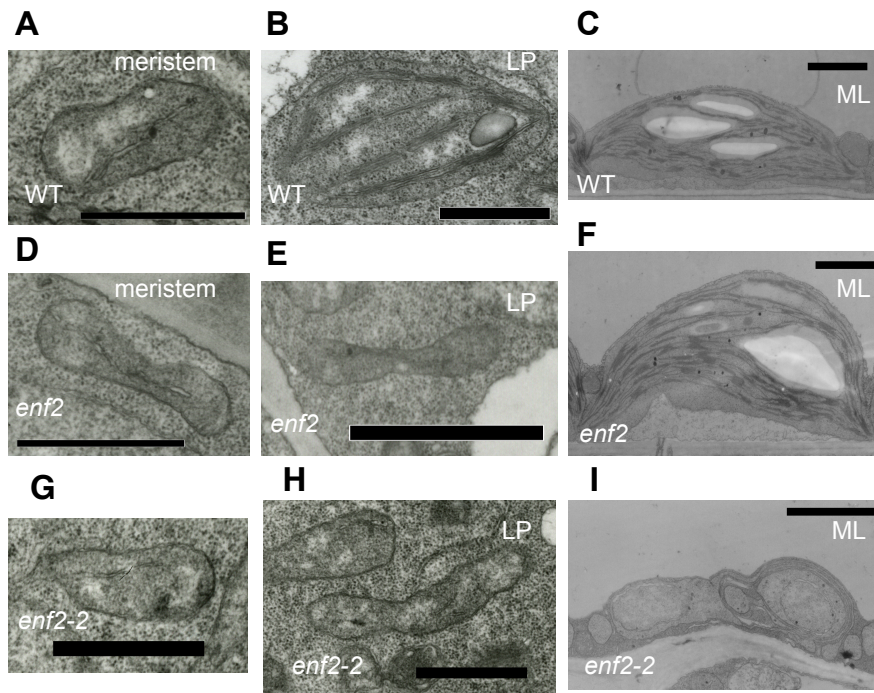


図15 *enf2*変異体における葉緑体(プラスチド)の透過型電子顕微鏡像

(A-C)野生型、(D-F)*enf2* (*enf2-1 ene*)、(G-I)*enf2-2*。

meristem: 茎頂分裂組織L2層の細胞、LP: 葉原基の向軸側葉肉の細胞、ML: 成熟葉の向軸側葉肉の細胞。

スケールバー: 1 μ m (A, B, D, E, G, H), 2 μ m (C, F, I)。

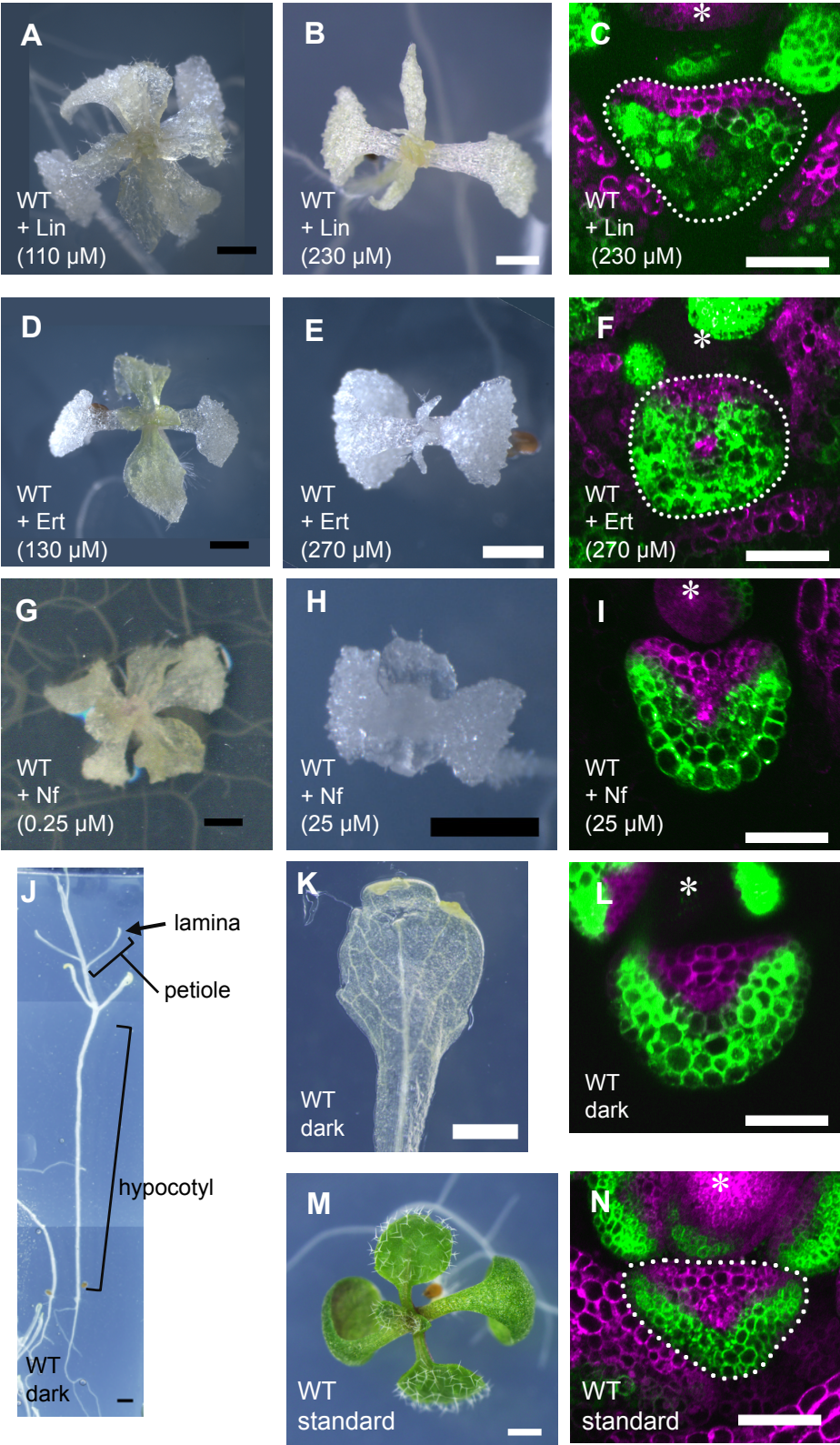


図16 葉緑体の発達阻害時の葉の形態および*FIL*と*PHB*の発現パターン

(A, B) リンコマイシン (Lin) 処理した野生型芽生え。濃度は左下に付記してある。

(D, E) エリスロマイシン (Ert) 処理した野生型芽生え。濃度は左下に付記してある。

(G, H) ノルフラゾン (Nf) 処理した野生型芽生え。濃度は左下に付記してある。

(J, K) 暗所生育 (dark) 芽生え。

(M) 標準的条件で生育した野生型芽生え。

(C, F, I, L, N) 各々の条件で育てた野生型における*FIL*の発現マーカー*FILpro::GFP*(緑) と*PHB*様遺伝子の発現マーカーと*35Spro::miYFP-W*(マゼンタ)の発現パターン。茎頂横断面の共焦点顕微鏡像。*: 茎頂分裂組織の真上。

スケールバー: 1mm (A, B, D, E, G, H, J, K, M), 50μm (C, F, I, L, N)。

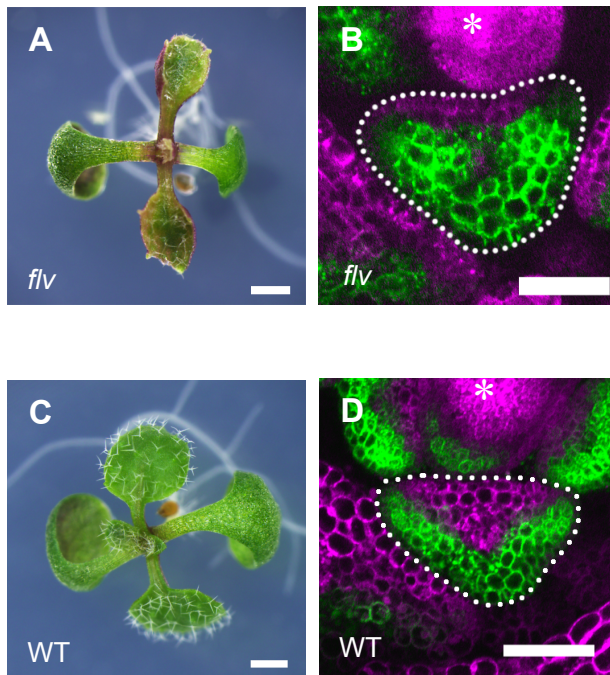


図17 *flv*変異体の葉の形態および*FIL*と*PHB*の発現パターン

(A, C) *flv*(A) と野生型 (C) の芽生え。

(B, D) *flv*(C) と野生型 (D) における*FIL*の発現マーカー*FILpro::GFP*(緑) と*PHB*様遺伝子の発現マーカーと*35Spro::mCherry*(マゼンタ)の発現パターン。茎頂横断面の共焦点顕微鏡像。*: 茎頂分裂組織の真上。

スケールバー: 1mm (A, C), 50μm (B, D)。

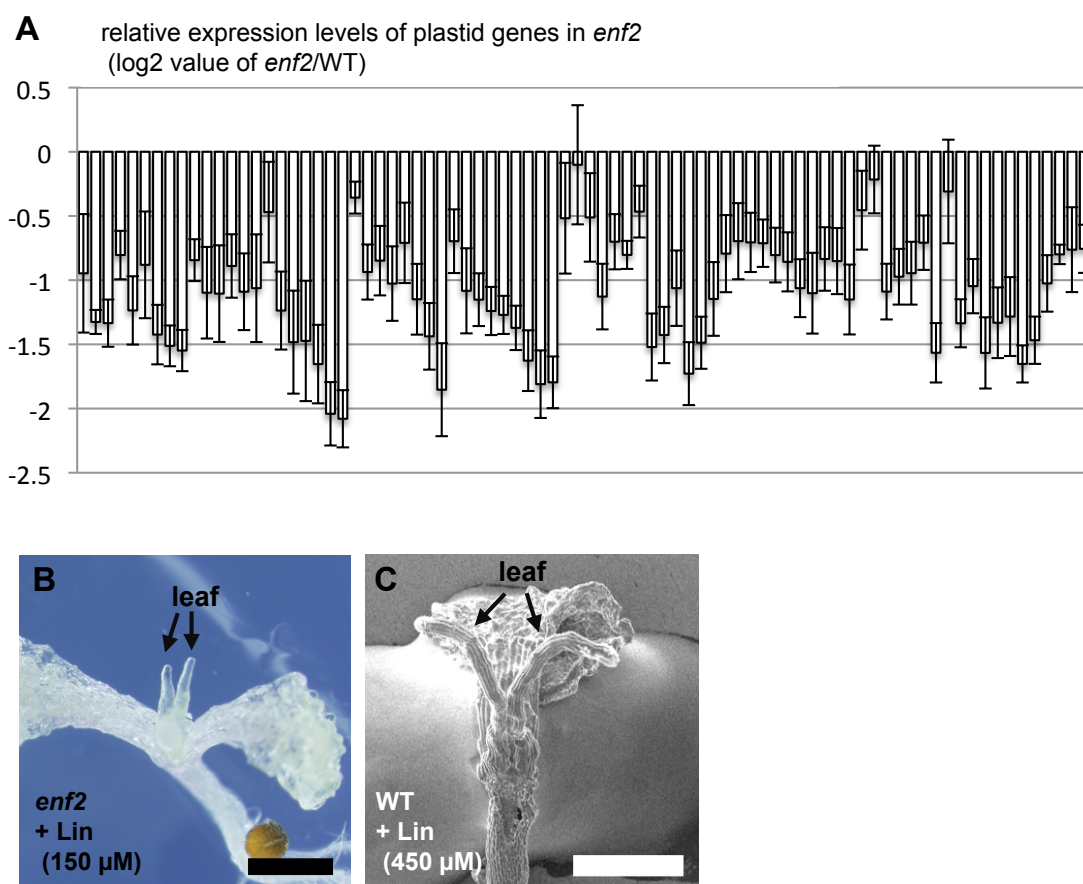


図18 *enf2*におけるプラスチドの遺伝子発現状態とリンコマイシンへの感受性
 (A) *enf2*芽生え茎頂でのプラスチド遺伝子の発現レベル。野生型に対する相対値をlog₂変換して縦軸に示す。個々の棒グラフは個々のプラスチド遺伝子の発現レベルを示し、横軸上での並びは、右端の2点を除く80遺伝子がプラスチドゲノム上の位置に応じて並んでいる。右端の二点はrRNA遺伝子。プライマー配列を示す表3と対応する。エラーバー: 平均値標準誤差。標本数はそれぞれn=4。
 (B, C) リンコマイシン処理した*enf2*(B)と野生型(C)の芽生え。リンコマイシン濃度は各々左下に付記。
 スケールバー: 1mm (B, C)。

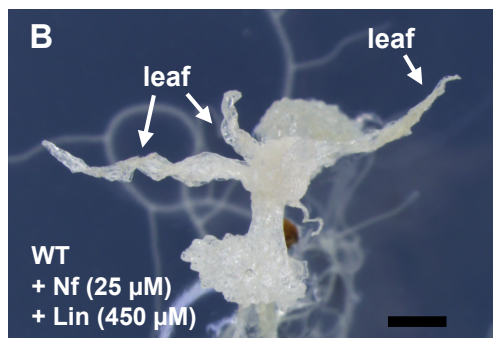
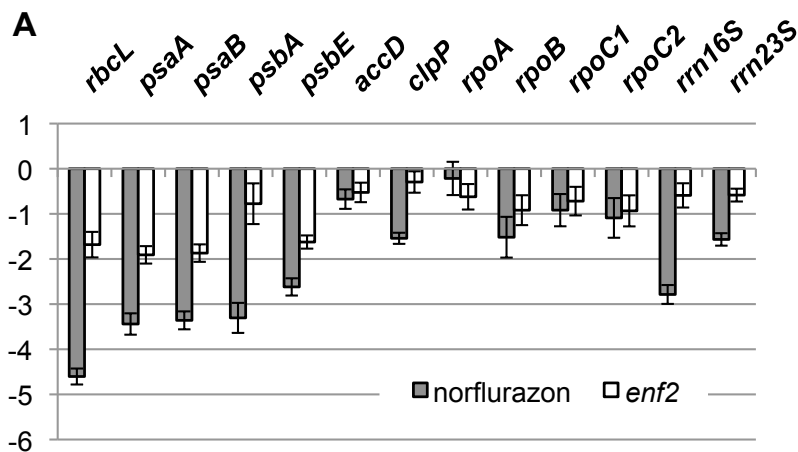


図19 ノルフラゾン処理によるプラスチドの遺伝子発現への影響と、リンコマイシンとノルフラゾン同時処理の効果

(A) ノルフラゾン処理芽生え(灰色)と *enf2* 芽生え(白) 茎頂でのプラスチド遺伝子の発現レベル。野生型に対する相対値を \log_2 変換して縦軸に示す。 *enf2* のデータは図18A と同一。エラーバーは標準誤差。標本数はそれぞれ $n=4$ 。

(B) ノルフラゾンとリンコマイシンを同時処理した芽生え。

スケールバー: 1mm(B)。

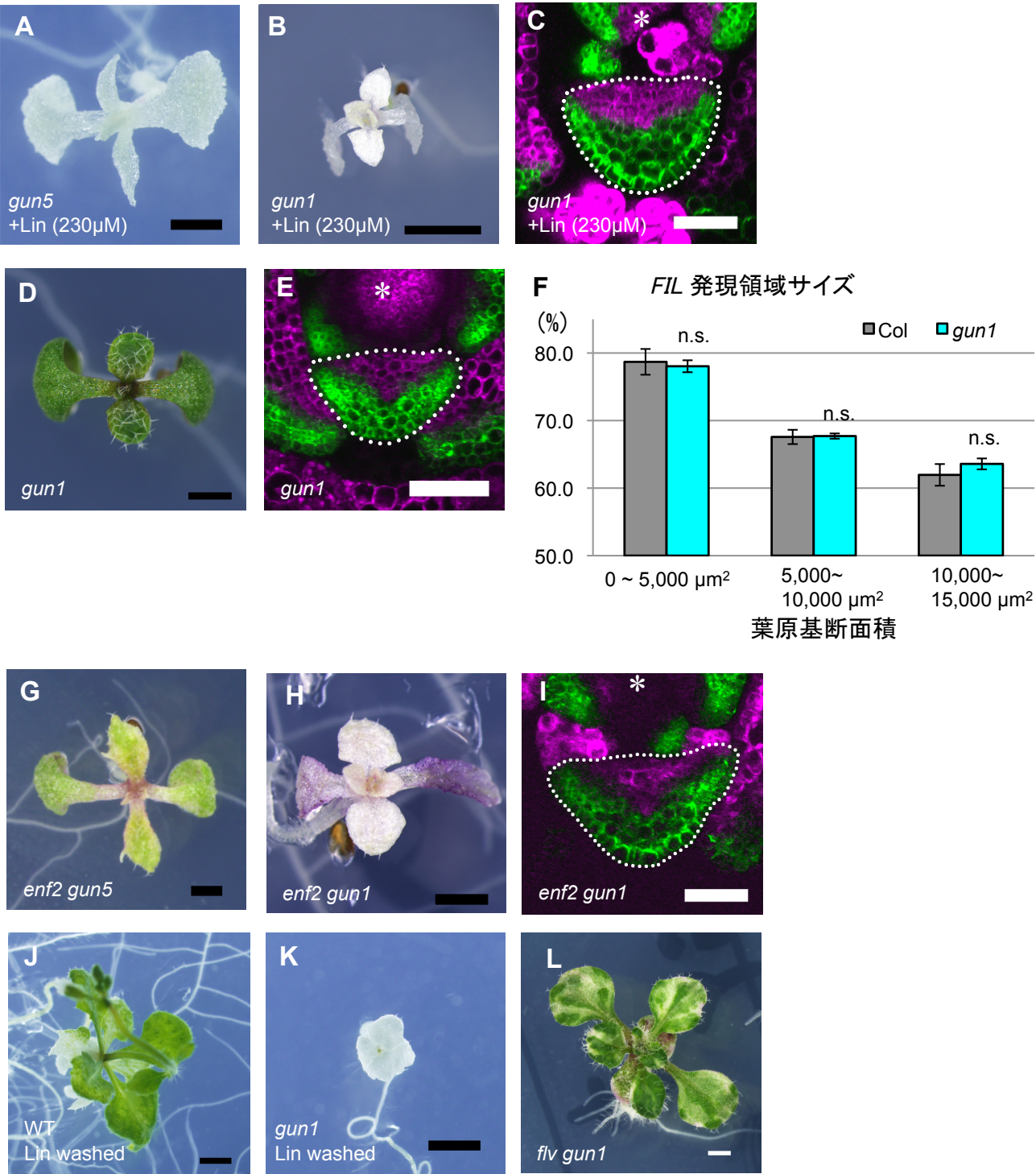


図20 *gun1*変異によるリンコマイシン処理および*enf2*変異の影響の抑圧

(A) リンコマイシン処理した*gun5-1*変異体の芽生え。

(B) リンコマイシン処理した*gun1-1*変異体の芽生え。

(C) リンコマイシン処理した*gun1-1*変異体の茎頂横断面における*FIL*の発現マーカー *FILpro::GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー *35Spro::miYFP-W* (マゼンタ)の蛍光パターン。共焦点顕微鏡像。

(D) 標準生育条件での*gun1-1*変異体の芽生え。

(E) 標準生育条件での*gun1-1*変異体の茎頂横断面における*FILpro::GFP*(緑)と *35Spro::miYFP-W* (マゼンタ)の蛍光パターン。共焦点顕微鏡像。

(F) 様々なサイズの葉原基横断面における*FILpro::GFP*の発現領域サイズの割合。

n. s. : 野生型と*gun1-1*で有意差無し。標本数はそれぞれ $n > 10$ 。

(G) *enf2 gun5-1*変異体の芽生え。

(H) *enf2 gun1-1*変異体の芽生え。

(I) *enf2 gun1-1*変異体の茎頂横断面における*FILpro::GFP*(緑)と *35Spro::miYFP-W* (マゼンタ)の蛍光パターン。共焦点顕微鏡像。

(J, K) リンコマイシン (230 μ M) 処理2週間の後標準生育条件に戻して2週間培養した野生型 (J) と*gun1-1*変異体 (K)。

(L) *flv gun1-1*変異体の芽生え。

*: 茎頂分裂組織の真上, スケールバー: 1mm (A, B, D, G, H, J, K, L), 50 μ m (C, E, I)。

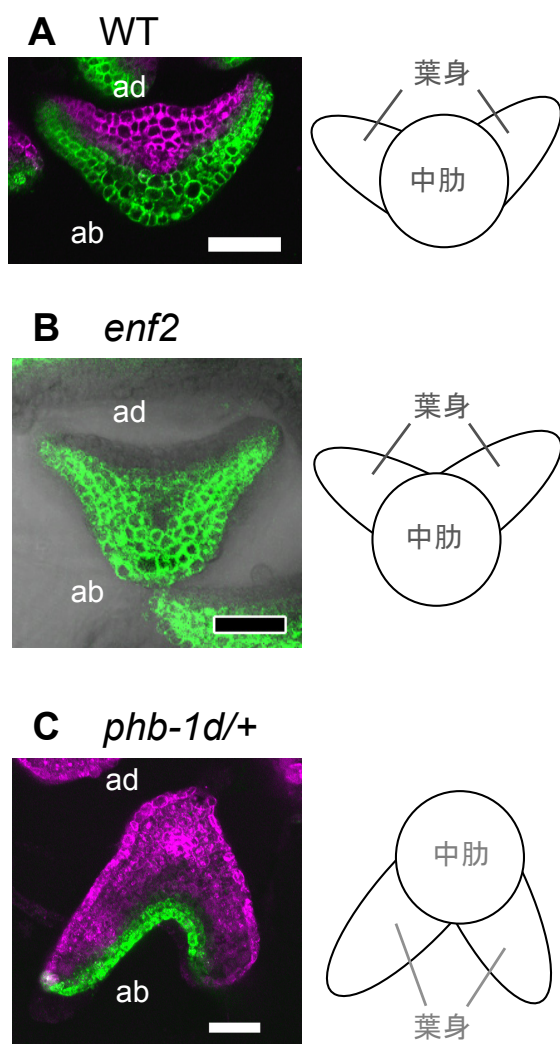
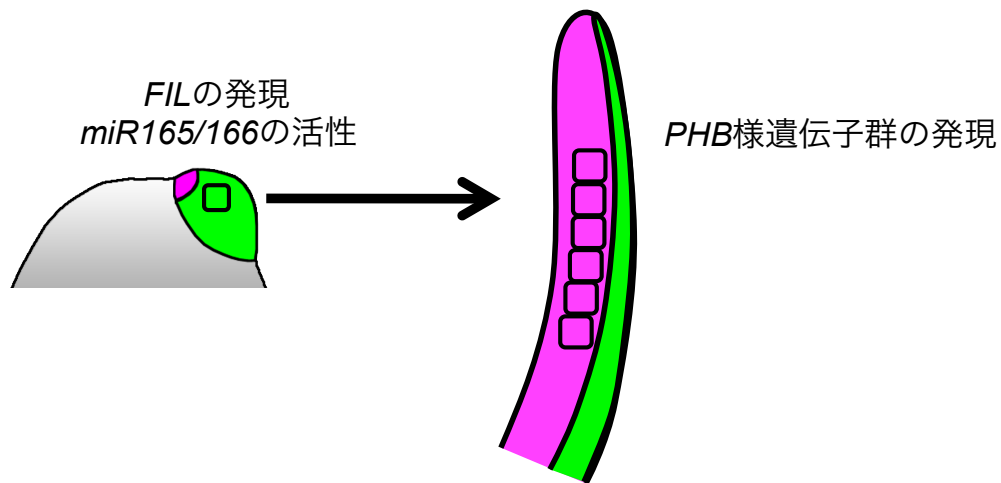
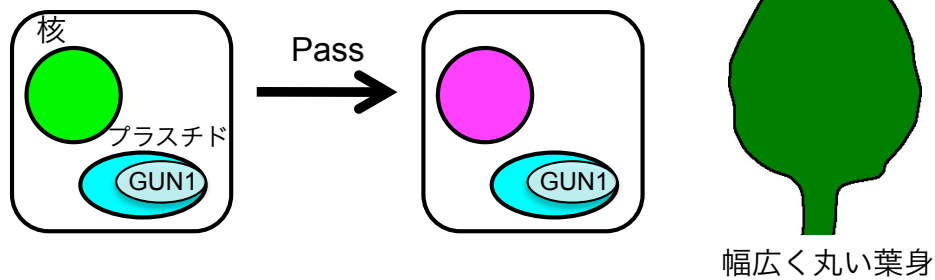


図21 葉の中肋に対する葉身の展開方向

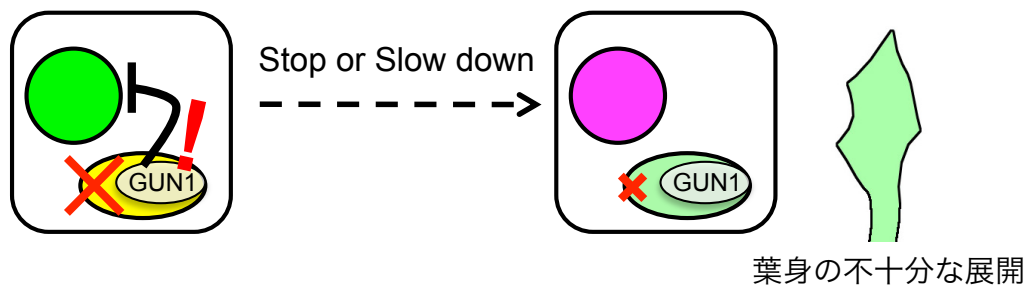
野生型(A)、*enf2*(B)、*phb-1d/+*(C)のP6-P8期葉原基の葉身基部の横断面。AとCは*FIL*の発現マーカー*FILpro:GFP*(緑)と*PHB*様遺伝子の発現マーカー*35Spro:miYFP-W*(マゼンタ)の蛍光パターンを示す共焦点顕微鏡像。Bは*FILpro:GFP*(緑)と微分干渉(DIC)像を示す共焦点顕微鏡像。各々右側に中肋と葉身の位置関係を模式図で示す。ad: 向軸側、ab: 背軸側, スケールバー: 50 μ m.



A WT (*GUN1*^{WT}) or *gun1*変異体
標準的生育条件



B *GUN1*^{WT}
プラスチド遺伝子発現異常時



C *gun1* 変異体
プラスチド遺伝子発現異常時

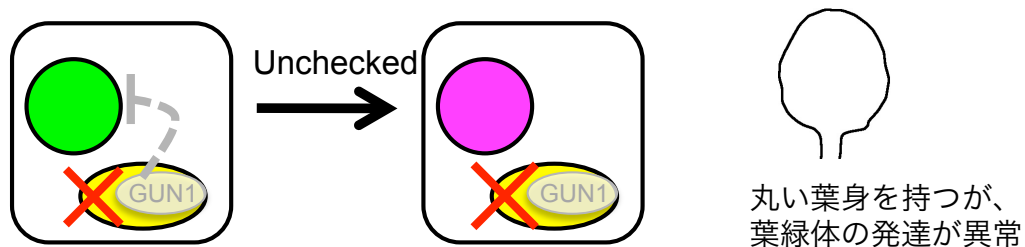


図22 プラスチドシグナルを介した*FIL*と*PHB*の発現動態制御のモデル

上の葉原基模式図の通り、葉の発生初期において、*FIL*発現細胞(miR165/166活性を持つ、緑色)から*PHB*様遺伝子発現細胞(*FIL*の発現とmiR165/166活性は抑えられている、マゼンタ)へ向軸側の細胞から順に切り替わってゆく。この遺伝子発現変化が決まった発生段階で起こることが、幅広く丸い葉身が展開する上で必要である。

このとき、

(A) *GUN1*遺伝子機能があっても無くても、プラスチド遺伝子発現に異常が無い場合には、*FIL*遺伝子発現細胞から*PHB*様遺伝子発現細胞への切り替わりが正常に起こり、幅広く丸い葉身が展開する。同時に葉緑体も発達し、成熟葉は高い光合成活性を持つ。

(B) プラスチド遺伝子発現が突然変異や外的かく乱によって阻害されると、*GUN1*依存シグナルによって、*FIL*遺伝子発現細胞から*PHB*様遺伝子発現細胞への切り替わりが遅延し、または起こらず、葉身の展開が不十分な細い葉となる。また同時に、*GUN1*依存的なプラスチド機能の修復によって、ある程度葉緑体の発達が起こり得る。

(C) *GUN1*機能が欠損しているとき、プラスチド遺伝子発現が阻害されても、まるでプラスチド遺伝子発現が正常なときのように、*FIL*遺伝子発現細胞から*PHB*様遺伝子発現細胞への切り替わりが起こり、丸い葉身が展開する。しかし葉緑体の発達は激しく阻害され、成長量の低下、稔性の低下を引き起こす。

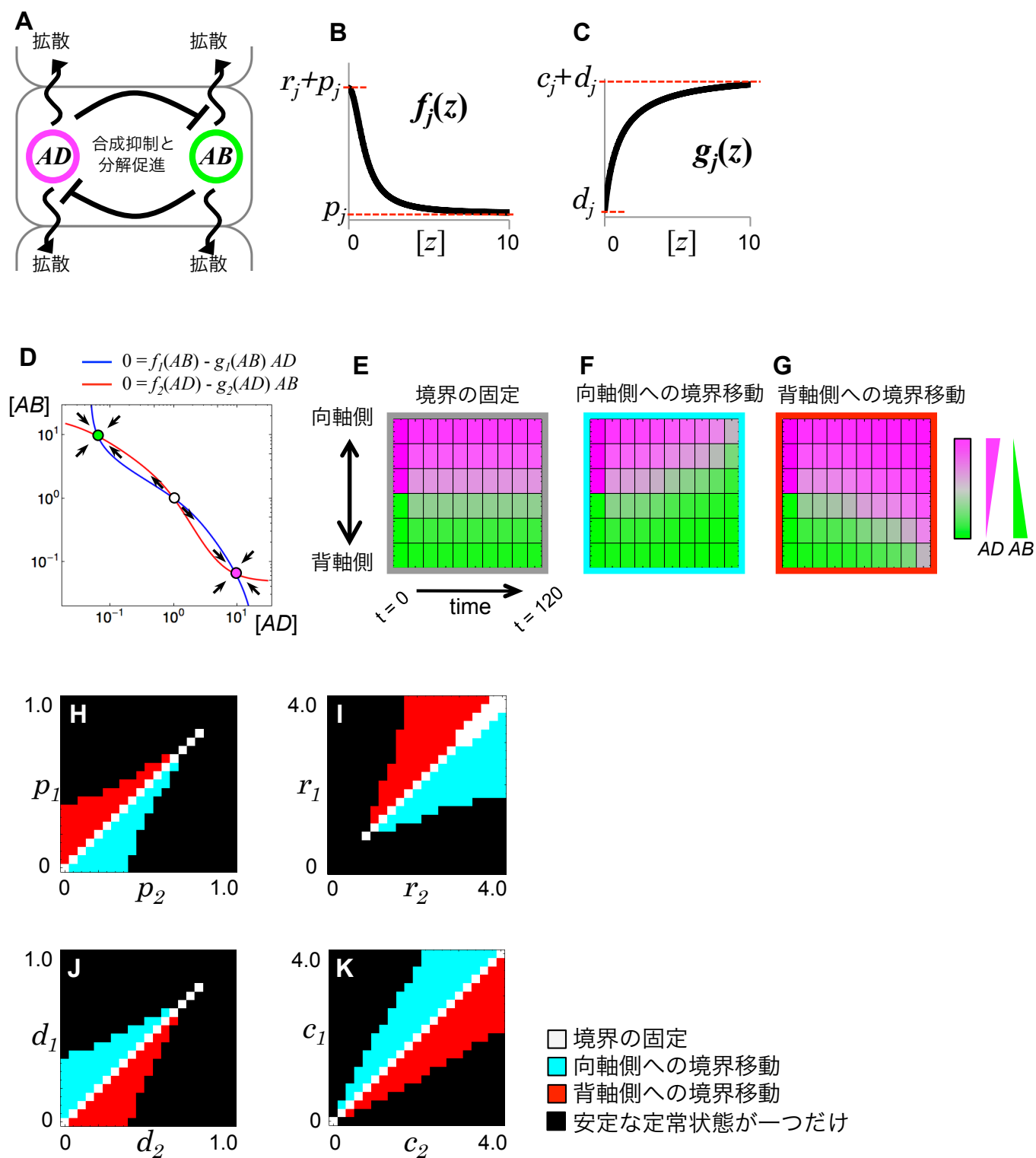


図23 二因子の相互抑制モデルによる、二つの遺伝子発現領域の境界移動の模倣

(A) 二因子の相互抑制モデルの概念図。 AD と AB は相互に合成抑制と分解促進によって互いの発現を抑える。また、濃度依存的に隣接する細胞へ移動する。

(B) AD と AB の合成速度を表す関数 f のプロット。

(C) AD と AB の分解速度を表す関数 g のプロット。

(D) 拡散をゼロとしたときの、式(1)と(2)のヌルクライン。矢印で AD と AB の値の時間発展の方向を示す。 AD 発現状態(マゼンタの丸)と AB 発現状態(緑の丸)のみが安定な定常状態である。

(E-G) 式(1, 2, 3, 4)に従うシミュレーション結果。向背軸に沿って並ぶ6細胞のうち、向軸側の3細胞を AD 発現状態に、背軸側3細胞を AB 発現状態に、初期値として設定した。Eに用いたパラメータ値は、 $p_1=p_2=0.1$, $r_1=r_2=2.0$, $d_1=d_2=0.1$, $c_1=c_2=2.0$, $D_{AD}=D_{AB}=0.1$ である。Fのパラメータは $r_2=1.8$ 以外はEと同じ、Gのパラメータは $r_1=1.8$ 以外はEと同じである。いずれもシミュレーション時間は $t=0$ から $t=120$ までである。

(H-K) AD と AB の発現領域の境界の移動方向とパラメータ値との関係を調べるため、 p_1 と p_2 の値(H)、 r_1 と r_2 の値(I)、 d_1 と d_2 の値(J)、 c_1 と c_2 の値(K)を変化させ、そのときの境界移動の方向を色の違いで示した。各々変化させている値以外は、 $p_1=p_2=0.1$, $r_1=r_2=2.0$, $d_1=d_2=0.1$, $c_1=c_2=2.0$, $D_{AD}=D_{AB}=0.1$ とした。

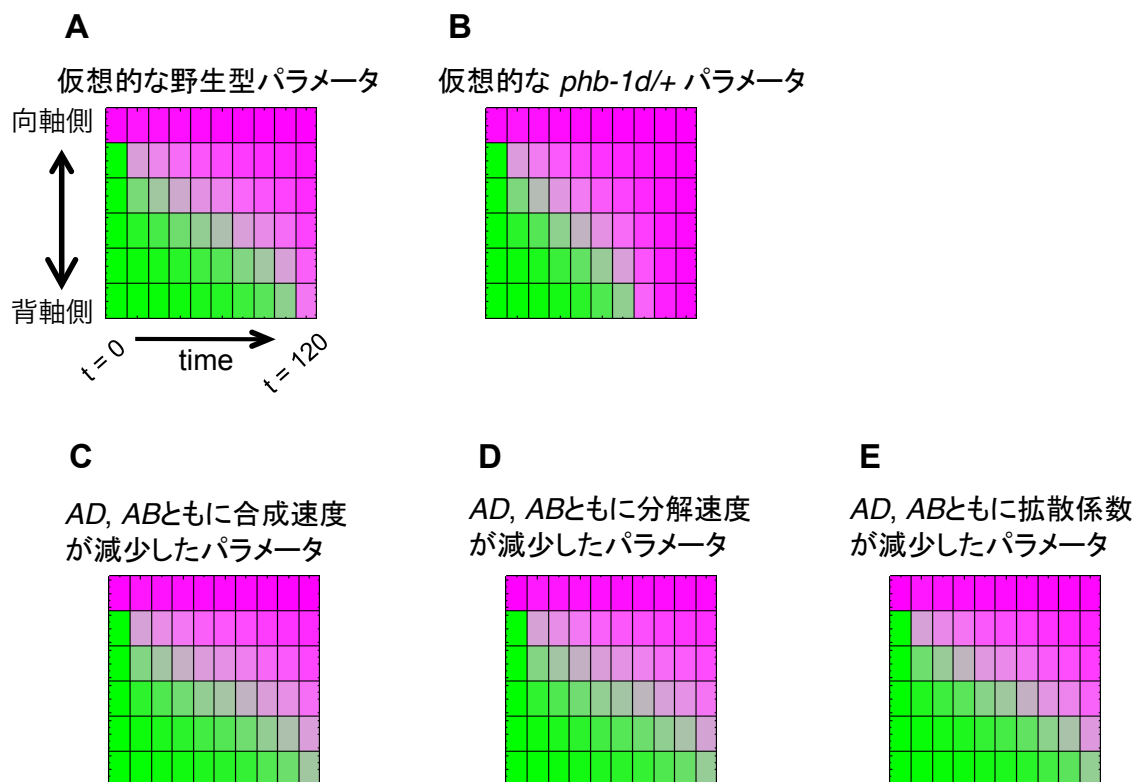


図24 二因子の相互抑制モデルを用いた、*phb-1d/+*と*enf2*の表現型を説明する仮説 (A-E) 向軸側1細胞をAD発現状態に固定して、残りの背軸側5細胞の初期値をAB発現状態としたときの式(1, 2, 3, 4)に従うシミュレーション結果。Aのパラメータは $p_1=p_2=0.1$, $r_1=2.0$, $r_2=1.7$, $d_1=d_2=0.1$, $c_1=c_2=2.0$, $D_{AD}=D_{AB}=0.1$ 、Bのパラメータは $c_1=1.9$ 以外はAと同じ、Cのパラメータは $p_1=p_2=0.05$ 以外はAと同じ、Dのパラメータは $d_1=d_2=0.05$ 以外はAと同じ、Eのパラメータは $D_{AD}=D_{AB}=0.09$ 以外はAと同じ。いずれもシミュレーション時間は $t=0$ から $t=120$ までである。

爲重 博士論文 表1

遺伝子型確認用プライマー

| 変異体 | 検出方法 | プライマー1 | プライマー2 | 制限酵素 | 野生型断片長(bp) | 変異体断片長(bp) |
|---------------------|--------------|---|--|---------|-----------------|------------|
| <i>enf2-1</i> | dCAPS | GGAAACACAGACAAGTGAACTAAAAGC | AGCTGATTTTGAAGCGTACAAG | HindIII | 124 | 101 |
| <i>enf2-2</i> | T-DNA境界配列の増幅 | CAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG ACATGATATTTACCTCTTAGATGGCCA | CTGATCTTGTTTCCCCTTTTGCT CTGATCTTGTTTCCCCTTTTGCT | | – 1022 | 535 – |
| <i>ene</i> | dCAPS | CAGGTCCGAGATGTAAAAGTTTTGTAC | CACCAACCTGAGCCATGTAAATAGGATC | BamHI | 74 | 103 |
| <i>sus2-4</i> | T-DNA境界配列の増幅 | TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC | CACAAGACAGTACAACATCTTACAAG | | | 943 |
| <i>sus2-5</i> | T-DNA境界配列の増幅 | TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC | AATCCATCAGCGCACAGAGACAG | | 381 | – |
| <i>SAIL_165_F07</i> | T-DNA境界配列の増幅 | TAGCATCTGAATTTATAACCAATCTCGATACAC | TCTCGGTATGAGTCAGGAACTCA | | – | 797 |
| <i>SALK_054291</i> | T-DNA境界配列の増幅 | CAGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG | TCTCGGTATGAGTCAGGAACTCA | | – | 650 |
| <i>gun1-1</i> | dCAPS | CTATTGCTAAGAGGATTTTCGAAACAG | GCGTCAATCACAGCATTGTAGG | AluI | 187 | 160 |
| <i>gun5-1</i> | dCAPS | CAACACCAAGTTCTACAGGG | GCTGTTGTGGGAATAGCCTGAGGATCCAAG | EcoT14I | | |
| <i>flv-1</i> | dCAPS | AGAGCATTTGATACAAAGATATCAAGTC | CCGTCACCTGCTGTTTTAAATTGTTG | Tsp45I | 118 | 88 |
| <i>rev-6</i> | CAPS | CCCGCGATTTCTGGACCCCTG | TGCCTTCCTAATCCATACAC | TaqI | 220 + 200 + 130 | 330 + 220 |
| <i>phb-13</i> | T-DNA境界配列の増幅 | AGCTGTTGCCCGTCTCACTGGTG GAGGGAGCAGCACAAAGATTG | GTAACATGTCAAAAAGCCATTT GTAACATGTCAAAAAGCCATTT | | ~600 | ~300 |

爲重 博士論文 表2

コンストラクション用プライマー

| AT1G80070/SUS2のクローニング | | | |
|-----------------------|--------------------------------------|---------------------------------------|--|
| プライマー名 | 用途 | 塩基配列 | |
| Acc65I-SUS2upF1 | AT1G80070/SUS2ゲノム断片の増幅5'端Acc65Iサイト付加 | CGGggtaccTGCCGATTCTCCCGGATTTTCA | |
| NotI-SUS2dnR1 | AT1G80070/SUS2ゲノム断片の増幅3'端NotIサイト付加 | ATGAGCTgcggccgcAGGAGGGATGATAAACTGCTGT | |
| CRE-GRクローニング | | | |
| CREstartF1-ApaI | CRE-GR(35STer含む)の増幅と5'端ApaIサイト付加 | accGGGCCCCacaatgtccaatttactgaccgtacac | |
| 35SterR1-SpeI | CRE-GR(35STer含む)の増幅と3'端SpeIサイト付加 | ggACTAGTAGGTCACTGGATTTTGGTTTTAGG | |
| FIL promoterクローニング | | | |
| FIL6kp-F1-ApaIKpnI | FIL promoterの増幅と5'端ApaIサイト付加 | accGGGCCCGGTaccgatattcgattactcacg | |
| FIL6kp-R1-ApaI | FIL promoterの増幅と3'端ApaIサイト付加 | accGGGCCCCctttttgtaagaaggggaaa | |

爲重 博士論文 表3

遺伝子発現解析およびスライシングパターン解析用プライマー

| 標的遺伝子 | AGIコード名 | プライマー1 | プライマー2 |
|------------------------------------|-----------|---|---|
| ENF2のスライシングパターン解析(RT-PCR)に用いたプライマー | | | |
| <i>ENF2</i> | AT1G31410 | ENF2 RT-PCR primer F1 (図14A, 青矢印) CCGATTGTCGTTACAGAGAATG | ENF2 RT-PCR primer R1 (図14A, ピンク矢印) AGGAGCTTTTCTCCGCATA |
| <i>ENF2</i> | AT1G31410 | ENF2 RT-PCR primer F1 (図14A, 青矢印) CCGATTGTCGTTACAGAGAATG | ENF2 RT-PCR primer R2 (図14A, オレンジ矢印) ACTCGTCCTCCTCTTTGTTCT |

| | | | |
|---|-----------|--------------------------|--------------------------|
| 向軸と背軸側に特異的に発現する転写因子群の発現解析(図10)に用いたプライマー | | | |
| <i>KAN1</i> | AT5G16560 | CCAAGGATGCGTTGGACTAGTAGC | TGCTCTTTCATGGCCGCCTAGAAG |
| <i>KAN2</i> | AT1G32240 | GCAGCAGCTTCGTGAGACAAT | TCGTCAATTCTCTGCTATCTCTCG |
| <i>KAN3</i> | AT4G17695 | GGTTGCTCTTTCATGACCCCAA | ACCTCCACGCCCATTTTGTAGAC |
| <i>FIL</i> | AT2G45190 | TGGTACAGCAACACATCGGACAG | GCCAAACCATCCTTCGGTTAATG |
| <i>YAB3</i> | AT4G00180 | GGTTGCCTGCCTTTATACGTTGGA | GACCCCAAGAGAAGCGACAAAGA |
| <i>YAB5</i> | AT2G26580 | AGGCAACAACTATGCAGTACCA | TACAATCCGTTGCTCAGTTATGG |
| <i>PHB</i> | AT2G34710 | AGGCCCTAGCAGAGTTCCTTT | AGAATTTGAGCAACCTTCATGG |
| <i>PHV</i> | AT1G30490 | CGTGATGTTAACACCCAGCTAA | CGTGAAACAGCTACGATACCAA |
| <i>REV</i> | AT5G60690 | CGAATAGTCCTGCTGGATTG | GATCTCTGCAATCTTCATAG |
| <i>AS2</i> | AT1G65620 | TCATCTCTCTCCTCCAACATCA | CCGAGGCTTTGGTACTTAGAGA |
| <i>ETT</i> | AT2G33860 | CAACACTTGTTCGGATGGTG | CCCACACCAAAATGTTCTCT |
| <i>ARF4</i> | AT5G60450 | ATACTACCCACCCGGAAC | TGAGACTGCATCGCAAAATC |

| | | | |
|------------------------------------|-----------|----------------------------|----------------------------|
| プラスチド遺伝子発現の解析(図18A, 図19A)に用いたプライマー | | | |
| <i>psbA</i> | ATCG00020 | TTACCCAATCTGGGAAGCTG | AGCAATCCAAGGACGCATAC |
| <i>matK</i> | ATCG00040 | TTTCTACGCAAGCGGTCTTC | ATCCTTTGTTGCCAGAATGC |
| <i>rps16</i> | ATCG00050 | AAAGCAACGAGCCGTTTATC | CCGTAAAAATCCCAGCCTTC |
| <i>rps12A</i> | ATCG00065 | ATCCGAAACGTCAGGAAATC | ACATGTTCTCGTCGCTGA |
| <i>psbK</i> | ATCG00070 | TAGTCGCCAAATTGCCAGAG | GAAAACTTACAGCGGCTTGC |
| <i>psbI</i> | ATCG00080 | TTTCTCTTTCATATTTGGATTCT | TTCTTCACGTCCCGATTAC |
| <i>atpA</i> | ATCG00120 | CCGGTAAACAGCAGTAGCC | GTAACGTAGCTGGGGAATCG |
| <i>atpF</i> | ATCG00130 | TACTTGGGTCACTGGCCATC | GCTCCTTCACGCAGTTCTTC |
| <i>atpH</i> | ATCG00140 | TGGGCTTGCTTCTATTGGAC | AAAGCGCTAATGCTACAACCA |
| <i>atpI</i> | ATCG00150 | ATTGGCAAATAGGGGGTTTC | GCCGTGAGTTGGAATTGTT |
| <i>rps2</i> | ATCG00160 | GGGCTCGGTGTCTATTATGTT | TCTTCAACACAGCTGCATCC |
| <i>rpoC2</i> | ATCG00170 | GGAGCCCGTAAAGGAGTTG | ATTTGAAAGGCGACACATC |
| <i>rpoC1</i> | ATCG00180 | CCCGAATGGATGGTTTATG | TCCACGGATTCCATTATCAAG |
| <i>rpoB</i> | ATCG00190 | AATTTTAGCGGATGGTGCTG | TGATCCTTTCAGGACCTTGG |
| <i>petN</i> | ATCG00210 | CGCATGGGCTGCTTTAAT | GAGTCCACTTCTTCCACACA |
| <i>psbM</i> | ATCG00220 | TGCACTCTTCATTCTCGTTCC | TCATTTTGACTAACGGTTTTACG |
| <i>psbD</i> | ATCG00270 | TTCCGTGCTTTTAACCCAAC | TGGGAAACGAACTCATAGGC |
| <i>psbC</i> | ATCG00280 | AGTGGCCCATTTTGACCTG | AAAGCCCAAACTGCAGAAAG |
| <i>psbZ</i> | ATCG00300 | TGCTTTCCAATTGGCAGTTT | CCCACCAAGAGACTAATCCA |
| <i>rps14</i> | ATCG00330 | AATCCCCACCGCGTAATAGT | AACATGCTGAACCATTTCC |
| <i>psaB</i> | ATCG00340 | GTCTGGGCATGGATGTTCTT | TGCTTGCACGATTGAAAGAG |
| <i>psaA</i> | ATCG00350 | GGGCGGTGAGTTAGTAGCAG | TCACAAGGGAACGAAAACC |
| <i>ycf3</i> | ATCG00360 | TCCAATACTCAGCGGCTTG | TTCGGGCATTAGAACGAAAC |
| <i>rps4</i> | ATCG00380 | CGATTGGGTATGGCTTTGAC | ATGGTTTGGAATTCCTCAG |
| <i>ndhJ</i> | ATCG00420 | GCAATGTGCCTATGATGTGG | TTTTCAAACCCAGAAAACG |
| <i>ndhK</i> | ATCG00430 | GATGTCTATTTGCCGGTTG | ATTTCCAATATGCGGACTGC |
| <i>ndhC</i> | ATCG00440 | TATAGAACCGATCGGGGATG | AACTCATTGCCACGGATAC |
| <i>atpE</i> | ATCG00470 | GCGGTTTTGCTAGAAAGGC | GTGTCCGAGCTCGTCTGAG |
| <i>atpB</i> | ATCG00480 | CCGTTTCGTACAAGCAGGAT | CGGGGTGAGTCAATCATCT |
| <i>rbcL</i> | ATCG00490 | TACCTGGTGTTCTGCCTGTG | GAGCTACTCGGTTGCCTACG |
| <i>accD</i> | ATCG00500 | CAATGCGACAATTGTTATGG | TTTTGCGCAGAGTCAATACG |
| <i>psaI</i> | ATCG00510 | ACTTACCGCTATTTTTGTGCTTT | TGAATATGAAGAAATAAGAACCCATT |
| <i>ycf4</i> | ATCG00520 | TATTTCCGTCCCAGCAAATC | AAGATGCGACGACTTTTTCC |
| <i>cemA</i> | ATCG00530 | TTTTTGCCCTGGTTGATCTC | TTGGATCGTTTCTTTGTGGA |
| <i>petA</i> | ATCG00540 | CAGAGGGCGAATCCATTAAA | GCCAAAACAACCGATCCTAA |
| <i>psbJ</i> | ATCG00550 | CTGGAAGGATTCCTCTTTGG | CAGGGATGAACCTAATCCTGA |
| <i>psbL</i> | ATCG00560 | CAATCAAATCCGACGAACA | GAAATAATTGAAAATAAACAGCAA |
| <i>psbF</i> | ATCG00570 | GGACCTATCCAATTTTACAGTGC | GTTGGATGAATGCATTGCT |
| <i>psbE</i> | ATCG00580 | TGCTGGAAGCACAGGAGAA | AACCGGTGCTGACGAATAAC |
| <i>petL</i> | ATCG00590 | TTTCGGTTTTCTACTAGCAGCTTT | TGCTTAGACCAATAAACAGAACTGA |
| <i>petG</i> | ATCG00600 | TCTAATCCTATTACTTTGGCTGGA | CCAAGTGATCACCGCTCTG |
| <i>psaJ</i> | ATCG00630 | ATGGTTCGGTTCGTTAGCAG | GGGAAATGTTAATGCATCTGG |
| <i>rpl33</i> | ATCG00640 | GCCAAGGGTAAAGATGTTCCG | CTTGATTTCCCGTGAAATTG |
| <i>rps18</i> | ATCG00650 | CCAAGCGATCTTTTCGTAGG | AAAGTCACTCTATTACCCGTCT |
| <i>rpl20</i> | ATCG00660 | TCGGAGGCGTAGAACAAAAC | CCATAAACGGCGAAAATCTC |
| <i>clpP</i> | ATCG00670 | GTCCGAGGAGCAATTACCAA | AAACCTTTGTGATGGTTTCG |
| <i>psbB</i> | ATCG00680 | TTTGCAGCTTTTGTTGTTGC | CGCCCAAGCTTCTGATAAAC |
| <i>psbT</i> | ATCG00690 | GGAAGCATTGGTTTATACATTTCTCT | AAATTTTAGGTGGTTCCCGAAA |
| <i>psbN</i> | ATCG00700 | GGAAACAGCAACCCTAGTCG | CGTGTTCTCGAATGGATCT |

裏面に続く

| | | | | |
|---------------|----------------------|-------------------------|---------------------------|----|
| <i>psbH</i> | ATCG00710 | TCTAGATCTGGTCCAAGAAGCA | CATTGCAACACCCATCAAAG | 続き |
| <i>petB</i> | ATCG00720 | GGTCGGCAAGTATGATGGTC | ATTTTGACCGCCCAATAACC | |
| <i>petD</i> | ATCG00730 | TCCTTTTGCAACTCCTTTGG | AAGACGGTTGTCGCTACTGG | |
| <i>rpoA</i> | ATCG00740 | GCGATGCGAAGAGCTTTACT | CCAGGACCTTGGACACAAAT | |
| <i>rps11</i> | ATCG00750 | TACTTGTGGATTCCGGGGTA | CAGCTCGTTGCATACCTTGA | |
| <i>rpl36</i> | ATCG00760 | AAATAAGGGCTTCGGTTCGT | CCTCGGGTTGGAACAAATTA | |
| <i>rps8</i> | ATCG00770 | TCGACCGGGTCTACGAATC | GTCGAGCTTCTCGGTCTGTC | |
| <i>rpl14</i> | ATCG00780 | ACAGCGGGGCTAGAGAATTG | TCGTCCCATTTGTACGTTTG | |
| <i>rpl16</i> | ATCG00790 | GACGTGGTGGAAAAATTGG | CATTTTGTATGCCGCTATTG | |
| <i>rps3</i> | ATCG00800 | CCAGAAATTCGAATCCGATAG | TTTTCCGTCGATACGTCTGT | |
| <i>rpl22</i> | ATCG00810 | AAAGCTGAGGTGAACCAAGG | GTCCCATAGGCCTCCACTAC | |
| <i>rps19</i> | ATCG00820 | GGGCATCCACCAATTATACC | ATTTTGGCATGTCCTCGAA | |
| <i>rpl2</i> | ATCG00830, ATCG01310 | CGGACCTCTCCAGAAGGTAAT | AAATGGGAAATGCCCTACCT | |
| <i>rpl23</i> | ATCG00840, ATCG01300 | TCGGTTATTGGGAAAAATC | TTTAACCTTTCGGGGAGTC | |
| <i>ycf2.1</i> | ATCG00860, ATCG01280 | CAGATAGGAAGGGCTGTTGC | TTCATCGGGTACGGGTAGAG | |
| <i>ycf15</i> | ATCG00870, ATCG01270 | TTCTTGAACAGCGAACAACC | AATCCGACATGCGTATTTTTG | |
| <i>ndhB</i> | ATCG00890, ATCG01250 | TGGGGCAAGCTCTTCTATTG | TGAGAAGGGGCTAGGGAAG | |
| <i>rps7</i> | ATCG00900, ATCG01240 | AAACTGCAAAATCCGATCCA | ATGAGTTGACCCGCTACAC | |
| <i>rps12C</i> | ATCG00905, ATCG01230 | ACGATTAACTCGGGATTTG | CGATCCTTTACTCCGACAGC | |
| <i>ycf1</i> | ATCG01000, ATCG01130 | TTTCGGAAGAAGGGGAAGAT | TTCGAACGTGGAATTTCATCA | |
| <i>ndhF</i> | ATCG01010 | CGGCGGGTATTTTCTTGTA | GGCTAAACCCCGCTTAATGT | |
| <i>rpl32</i> | ATCG01020 | CTCGAAAAAGCGTATTCGTAAAA | TGAATTACCTGTAGAAAGTGATTTC | |
| <i>ycf5</i> | ATCG01040 | CACAATAACTGCGCCAAGTG | CATAACAGAGCGCCATAGCC | |
| <i>ndhD</i> | ATCG01050 | CACTTTAGCGGCTTTTCCAG | CCACCCACATGGATAAAAG | |
| <i>psaC</i> | ATCG01060 | TGTACTCAATGTGTCGAGCA | ACCAACACAGTCCTCGGTTG | |
| <i>ndhE</i> | ATCG01070 | TTCCCAACTAAAAGGGGAAA | CGATTGGTTTATGCGAATTGA | |
| <i>ndhG</i> | ATCG01080 | CATGGTACGGGGTTATTTGG | TTGACGAGCCACAGAAATTG | |
| <i>ndhI</i> | ATCG01090 | CAAACCTACGAGCTGCAAG | CCAATCAACAACAGGCAATC | |
| <i>ndhA</i> | ATCG01100 | CTTCAAGCTCTAGCCGATGG | TCCGCTAAACAAGGTGATTG | |
| <i>ndhH</i> | ATCG01110 | ATGGGAAATTCATGGCAAA | TCAAAGCCCTGCTTTCTAA | |
| <i>rps15</i> | ATCG01120 | AAGCAGGGGATCCGTTGAA | GACAAATAAGCCAGCAGTCG | |
| <i>rrn16S</i> | ATCG00920 | CGGTATCTGGGGAATAAGCA | GATTTGACGGCGGACTTAAA | |
| <i>rrn23S</i> | ATCG01180 | GGGCGACTGTTTACCAAAAA | TTACCCGACAAGGAATTCG | |

遺伝子発現解析の際、内部標準遺伝子のために用いたプライマー

| | | | |
|-----------------------|-----------|--------------------------|------------------------|
| <i>beta-6-tubulin</i> | AT5G12250 | ACCACTCCTAGCTTTGGTGATCTG | AGGTTCACTGCGAGCTTCCTCA |
| <i>18S rRNA</i> | | CAGATACCGTCTAGTCTCAACCA | CAGCGGAGTCTATAAGCAACAT |